



SYDÄNERILAISTUSTEHOKKUUDEN VERTAILU ERI SOLULINJOJEN VÄLILLÄ KÄYTETTÄESSÄ PIENMOLEKYYLIERILAISTUSMENETELMÄÄ

Miia Lehtinen

Opinnäytetyö
Toukokuu 2014
Laboratorioalan koulutusohjelma
Tampereen ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma

MIIA LEHTINEN

Sydänerilaistustehokkuuden vertailu eri solulinjojen välillä käytettäessä pienmolekyylierilaistusmenetelmää

Opinnäytetyö 50 sivua, joista liitteitä 1 sivu
Toukokuu 2014

Ainoastaan erittäin monikykyisistä eli pluripotentista kantasoluista voidaan tuottaa kaikkia yksilön solutyyppejä ja tällaisia kantasoluja ovat alkion kantasolut ja ns. iPS-solut. Indusoidut pluripotentit kantasolut (iPS-solut) ovat kantasoluja, jotka on tuotettu uudelleen ohjelmoimalla erilaistuneita somaattisia soluja. iPS-soluteknologian avulla on mahdollista tuottaa tautimalleja esimerkiksi geneettisille sydänsairauksille ja tutkia geenivirheiden vaikutusta sydänsolujen toimintaan ja kehittymiseen. Tulevaisuudessa iPS-soluteknologialla tuotetuilla kantasoluilla voidaan myös mahdollisesti korjata kudosisvauriota, esimerkiksi sydäninfarktin jälkeen, koska potilaan omista iPS-soluista tuotettuina ne eivät aiheuta hylkimisreaktiota.

Sydänlihassoluja voidaan erilaistaa pluripotentista kantasoluista useilla eri menetelmillä. Kantasolututkimuksen tavoitteena on tuottaa sydänsoluja terapeuttisiin sovelluksiin, ja siksi on tärkeää kehittää menetelmiä, joissa ei käytetä terveydelle vaarallisia eläinperäisiä materiaaleja. Yksi tällainen menetelmä on pienmolekyylierilaistusmenetelmä, jossa kantasolut erilaistetaan erilaistumisen signaalintireitteihin vaikuttavien pienmolekyylien avulla.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää mahdollisia solulinjojen välisiä eroja sydänerilaistustehokkuudessa käytettäessä pienmolekyylierilaistusmenetelmää. Tarkoituksena oli erilaistaa neljä iPS-solulinjaa pienmolekyylierilaistusmenetelmällä sydänlihassoluiksi eri solumäärillä, karakterisoida niitä ja verrata tuloksia keskenään. Karakterisointiin käytettiin immunosytokemiallisia värjäyksiä ja Cytospin-menetelmää. Osa opinnäytetyön tausta-aineistosta on luottamuksellista, eikä sitä esitellä tässä julkaisussa.

Solulinjojen välillä havaittiin selkeitä eroja erilaistumistehokkuuksissa. Myös saman solulinjan eri erilaistuskertojen välillä oli eroja. Menetelmän toistettavuus ja ennustettavuus todettiin heikoiksi ja rutiininomainen käyttö hankalaksi. Jotta päästäisiin parhaisiin erilaistumistuloksiin, menetelmä tulisi optimoida jokaiselle solulinjalle erikseen.

Asiasanat: sydänerilaistus, pienmolekyylierilaistusmenetelmä, sydänlihassolu, iPS-solu, pluripotentti kantasolu

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Sciences

MIIA LEHTINEN:

The Efficiency of Heart Differentiation between Cell Lines by Using a Small Molecule Differentiation Method

Bachelor's thesis 50 pages, appendices 1 page
May 2014

Only pluripotent stem cells can be used to produce any human cell types and such cells are human embryonic stem cells and iPS-cells. Induced pluripotent stem cells (iPS-cells) are cells which are made by reprogramming somatic cells. With iPS-cell technology, it is possible to produce disease models for genetic heart diseases and study the effects on the gene mutations to cardiomyocytes development and function. In future, iPS-cells can be used to fix tissue damage, for example, after myocardial infarction. A patient's body doesn't ostracize iPS-cells, because they are made from a patient's own somatic cells.

Cardiomyocytes can be differentiated from stem cells by different methods. The main aim of the research is to produce cardiac cells for clinical applications. Therefore, it is important to generate methods, which do not contain any material of animal origin. One of these methods, is small molecule differentiation method. In this method, pluripotent stem cells are differentiated to cardiomyocytes by small molecules affecting cardiac differentiation pathways.

The aim of this thesis was to study the efficiency of heart differentiation between cell lines by using a small molecule differentiation method. The purpose was to differentiate four iPS-cell lines to cardiomyocytes by a small molecule differentiation method and to characterize these cells. The results were compared with each other. Cardiac cells were characterized by immunocytochemistry staining and Cytospin. A part of the thesis contains confidential information.

There were clear differences in the efficiency of heart differentiation between cell lineages. There were also differences between differentiation times in the same cell line. Repeatability and predictability of the small molecule differentiation method were weak and using this method routinely is problematic. In order to achieve the best results it is recommended to optimize a small molecule differentiation method for each cell line separately.

Key words: heart differentiation, small molecule differentiation method, cardiomyocyte, iPS-cell, pluripotent stem cell

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	TEORIATAUSTA.....	7
2.1	Kantasolut	7
2.1.1	Alkion kantasolut	8
2.1.2	Aikuisen kantasolut.....	9
2.1.3	iPS-solut	9
2.2	Kantasolujen viljely	11
2.3	Sydämen kehitys ja solujen erilaistuminen.....	12
2.4	Sydänlihassolut	14
2.5	Työssä käytetyissä solulinjoissa esiintyvät sydänsairaudet	15
2.5.1	Katekoliamiiniherkkä monimuotoinen kammiothelyöntisyys	16
2.5.2	Hypertrofinen kardiomyopatia	17
2.5.3	Pitkä QT-oireyhtymä.....	17
2.6	Kantasolujen erilaistusmenetelmät	18
2.6.1	END2-menetelmä.....	19
2.6.2	EB-menetelmä.....	20
2.6.3	Feeder-free-menetelmät	21
3	OPINNÄYTETYÖN TAVOITE JA TARKOITUS.....	23
4	MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	24
4.1	Työssä käytetyt solulinjat	24
4.2	Kantasolujen viljely	24
4.3	Kantasolujen jakaminen.....	25
4.4	Kantasolujen pakastaminen ja sulatus	26
4.5	Pienmolekyylierilaistusmenetelmä	27
4.6	Erilaistuneiden solujen tarkastelu mikroskoopilla.....	29
4.7	Immunosytokemialliset värjäykset	30
4.8	Cytospin	32
5	TULOKSET	34
5.1	Sykkivien soluaggregaattien mikroskopointi.....	34
5.2	Immunovärjäykset	37
5.3	Cytospin.....	40
6	POHDINTA.....	42
	LÄHTEET.....	46
	LIITTEET	50
	Liite 1. Immunosytokemiallisten värjäysten protokolla.....	50

ERITYISSANASTO

blastokysti	alkiorakkula
CPVT	katekoliamiiniherkkä monimuotoinen kammiotheälyöntisyys
EB	embryoid body, spontaanisti muodostuva soluaggregaatti
END2	hiiren viskeraalis-endodermaalinen solulinja
feeder-solut	tukisolut, joiden päällä kantasoluja viljellään tai erilaistetaan
feeder-free	viljely tai erilaistus ilman tukisoluja
fenotyyppi	ilmiasu, kaikkien havaittavien ominaisuuksien kokonaisuus
fibroblasti	sidekudoksen perussolu, esimerkiksi ihossa
fiksaus	solujen kiinnitys alustaan värjäystä varten
gastrulaatio	alkionkehityksen vaihe, jossa muodostuu kolme alkiokerrosta: endodermi, mesodermi ja ektodermi
HCM	hypertrofinen kardiomyopatia
inhibiittori	aine, joka estää entsyymien tai signaalintireitin toiminnan
iPS-solu	Indusoitu pluripotentti kantasolu eli uudelleen ohjelmoitu kantasolu
kardiogeneesi	sydämen ja sydänsolujen kehittyminen
karyotyyppi	kromosomien määrä ja rakenne
kolonia	tiivis solurypäs
konfluentti	täyteen kasvanut soluviljelykaivo
kouttaus (engl. coating)	soluviljelykaivon pohjan peittäminen solujen tarttumisen mahdollistavalla aineella
LQT	Pitkä QT-oireyhtymä
markkeri	merkkiaine, esimerkiksi sydänsolulle tyypillinen proteiini
MEF	hiiren alkion fibroblasti
medium	solujen elatus- ja kasvatusliuos
multipotentti	monikykyinen
pleittaus (engl. plating)	solujen siirto kuoppalevyille
pluripotentti	erittäin monikykyinen
resuspensointi	solupelletin liuotus haluttuun nestemäärään
supernatantti	sentrifugoinnin jälkeen solupelletin päällä oleva neste
totipotentti	kaikkikykyinen
troponiini T	sydänsoluille spesifinen proteiini

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston ja Tampereen teknillisen yliopiston yhteisen tutkimusinstituutin BioMediTech:n Sydänryhmässä. Sydänryhmää johtaa professori Katriina Aalto-Setälä. Opinnäytetyön ohjasi laboratorioanalyttikko Henna Venäläinen.

Sydänryhmässä tutkitaan sydänsolujen erilaistamista pluripotentista kantasoluista ja näiden solujen toiminnallisuutta. Erilaistusmenetelmien kehittäminen ja sydänsolujen ylläpito soluviljelmissä on myös tärkeä tutkimuskohde. Ryhmässä hyödynnetään ja tuotetaan iPS-soluja. iPS-soluteknologian avulla on ollut mahdollista tuottaa solutason tautimalleja Sydänryhmän tutkimille geneettisille sydänsairauksille ja tutkia geenivirheiden vaikutusta sydänsolujen toimintaan. Tautimalleja voidaan hyödyntää myös esimerkiksi lääkeaineiden testaamisessa.

Sydänryhmässä käytetään kantasolujen erilaistamiseen pääosin END2-menetelmää. Siinä kantasolut erilaistetaan viljelemällä niitä hiiren viskeraalis-endodermaalisten solujen päällä. Myös EB-menetelmää, jossa kantasolujen annetaan spontaanisti erilaistua kaikkiin kolmeen alkiokerrokseen, käytetään jonkin verran. Uusimpana menetelmänä käyttöön on otettu pienmolekyylierilaistusmenetelmä, jossa solut erilaistetaan kardiogeneesin signalontireitteihin vaikuttavien pienmolekyylien avulla.

Pienmolekyylierilaistusmenetelmä on feeder-free-menetelmä, eli siinä ei käytetä tukisoluja kantasolujen erilaistamiseen. Lisäksi erilaistus tapahtuu täysin tunnetuissa ja määritellyissä olosuhteissa. Menetelmällä pystytään saamaan aikaiseksi myös haluttu yksikerroksinen, eli monolayer, solumatto. Tästä syystä pienmolekyylierilaistusmenetelmällä tuotetut sydänlihassolut olisivat soveltuvampia terapeuttisiin sovelluksiin verrattuna END2- ja EB-menetelmällä tuotettuihin sydänlihassoluihin.

Tässä opinnäytetyössä on tavoitteena selvittää solulinjojen välisiä eroja erilaistumistehokkuudessa, kun kantasolujen erilaistukseen käytetään pienmolekyylierilaistusmenetelmää. Opinnäytetyön tausta-aineisto on osittain luottamuksellista, eikä sitä esitellä tässä julkaisussa.

2 TEORIATAUSTA

2.1 Kantasolut

Kantasolut ovat erilaistumattomia soluja, joilla on kyky jakautua ja erilaistua eri kudostyyppien soluiksi (Odorico, Kaufman & Thomson 2001). Niiden jakautumiskyky on rajaton, mikäli soluilla on riittävästi ravintoa ja tilaa jakautumiseen. (Bongso & Lee 2005). Kantasolut kykenevät jakautumaan joko kahdeksi jakautumiskykyiseksi tytärsoluksi tai erilaistuvaksi soluksi ja jakautumiskykyiseksi tytärsoluksi (Odorico, Kaufman & Thomson 2001).

Kantasolut luokitellaan totipotentteiksi, pluripotentteiksi ja multipotentteiksi. Totipotentit kantasolut pystyvät erilaistumaan mihin tahansa elimistön kudostyyppiin ja lisäksi istukan soluiksi, minkä vuoksi ne kykenevät muodostamaan kokonaisen uuden elinkykyisen yksilön. Pluripotentit kantasolut ovat erittäin monikykyisiä ja kykenevät erilaistumaan kaikkiin kolmeen alkiokerrokseen, eli mihin tahansa elimistön kudostyyppiin, mutta eivät istukan soluiksi. Multipotentit kantasolut sen sijaan pystyvät erilaistumaan vain tietyn solulinjan soluiksi. Lisäksi joissakin yhteyksissä puhutaan unipotentteista kantasoluista, mutta niitä voidaan kutsua myös tietyn solutyypin esiasteiksi, sillä ne pystyvät erilaistumaan vain määrätyksi solutyypiksi. (Bongso & Lee 2005.)

Varhaisen alkion solut ovat pluripotentteja kantasoluja. Niitä voidaan eristää tutkimuskäyttöön hedelmöityshoidoista ylijääneistä alkioista. Kantasoluja löytyy myös aikuisen kudoksista, esimerkiksi luuytimeistä. Niiden erilaistumiskyky on kuitenkin rajoittunut, eli ne ovat multipotentteja. Lisäksi kantasoluja voidaan saada abortoitujen sikiöiden elimistä, mutta tätä Suomessa käytetään harvoin. Veren kantasoluja voidaan eristää synnytyksen jälkeen istukasta ja myöhemmin niitä tuottaa pääasiassa luuydin. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2003.) Edellä mainittujen lisäksi pluripotentteja kantasoluja saadaan uudelleen ohjelmoimalla erilaistuneita somaattisia soluja. Näitä kutsutaan indusoiduiksi pluripotentteiksi kantasoluiksi (iPS-solut). (Takahashi & Yamanaka 2006.)

2.1.1 Alkion kantasolut

Munasolun hedelmöittyessä alkaa kiivas solunjakautuminen, ja solujen lukumäärä kasvaa (Paananen ym. 2006). Hedelmöityksestä morulaksi eli muurainasteeseen asti alkion solut ovat totipotentteja (Bongso & Lee 2005) Tämän jälkeen morulan sisälle tunkeutuu nestettä, ja alkiosta muodostuu varhainen alkiorakkula eli blastokysti 5-6 päivän iässä. Blastokystissä on ulompi solukerros, eli trofoblasti, ja sen sisällä sisäsolumassa. Trofobalstista kehittyvät istukka ja sikiökalvot. (Paananen ym. 2006.) Sisäsolumassan solut ovat pluripotentteja ja kykenevät erilaistumaan kaikkiin elimistön kudostyyppisiin (Bongso & Lee 2005).

Alkion kantasoluja tutkimuskäyttöön saadaan hedelmöityshoidoissa ylijääneistä alkioista. Hedelmöittyneen munasolun annetaan jakautua noin 6-7 päivän ajan. Tällöin alkio koostuu noin sadasta solusta, ja sen sisäsolumassa on 20-30 solun kokoinen. Jos alkioita ei siirretä kohtuun, sen sisäsolumassan solut voidaan eristää tutkimuskäyttöön. Alkion kantasolut soveltuvat hyvin tutkimuskäyttöön, sillä ne voivat jakautua loputtomasti viljelyolosuhteissa ja kykenevät erilaistumaan kaikiksi solutyypeiksi. Alkion kantasolujen eristäminen sisäsolumassasta kuitenkin tuhoaa alkion. Tästä aiheutuvat alkion kantasolujen käyttöön liittyvät eettiset ongelmat. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta ym. 2003.)

Suomessa laki lääketieteellisestä tutkimuksesta (1999) säätelee alkioiden käyttöä tutkimuksissa. Jokainen alkioita tutkimuksissaan käyttävä laitos tarvitsee siihen luvan sosiaali- ja terveysalan lupa- ja valvontavirastolta (Valvira). Lisäksi jokaista tutkimusta varten on saatava eettisen toimikunnan myönteinen lausunto tutkimussuunnitelmasta. Alkion käyttämiseen tutkimuksessa tarvitaan myös sukusolujen luovuttajien lupa. Laki määrää myös, että alkioiden tuottaminen yksinomaan tutkimustarkoituksiin on kielletty ja alkioita ei saa pitää elossa 14 vuorokautta enempää.

Tiukasta lainsäädännöstä ja eettisistä ongelmista johtuen alkion kantasolujen käyttö tutkimustarkoituksiin on hankalaa. iPS-soluteknologian (kappale 2.3.1, sivu 9) kehittämisen myötä alkion kantasolujen käyttöä tutkimustarkoituksiin on pystytty vähentämään ja osittain luopumaan niistä kokonaan.

2.1.2 Aikuisen kantasolut

Aikuisen yksilön kudoksista löytyy myös jonkin verran kantasoluja. Niiden jakautumis- ja erilaistumiskyky on huomattavasti heikompi kuin alkion kantasolujen. (Bongso & Lee 2005.) Aikuisen kantasolut voivat olla unipotentteja, bipotentteja, tripotentteja tai multipotentteja. Unipotentit kantasolut kykenevät erilaistumaan vain yhdeksi solutyypiksi, bipotentit kahdeksi, tripotentit kolmeksi ja multipotentit kantasolut useammaksi solutyypiksi. On myös raportoitu, että jotain pluripotentteja kantasoluja olisi aikuisen yksilön kudoksissa. (Young & Black 2004.) Yleensä nämä solutyypit kuuluvat kuitenkin samaan kehityslinjaan, esimerkiksi verisoluihin (Bongso & Lee 2005). Aikuisen kantasolujen tehtävänä on tuottaa uusia soluja uusiutuviin kudoksiin ja korjata elämän aikana mahdollisesti vaurioituvia kudoksia ja elimiä (Young & Black 2004).

Yleisimmin tunnettu aikuisen kantasolujen lähde on luuydin (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2003). Se tuottaa hematopoieettisia, eli veren kantasoluja, sekä mesenkymaalisia kantasoluja. Hematopoieettisista kantasoluista erilaistuu verisoluja ja mesenkymaalisista kantasoluista esimerkiksi rusto-, luu-, lihas- ja rasvasoluja. Myös ihossa ja muissa nopeasti uusiutuviin kudoksissa on kantasoluja. Lisäksi luusta ja hermostosta on löydetty kantasoluja. (Bongso & Lee 2005.) Luuytimen kantasolut ovat helposti eristettävissä, sillä tietyt kasvutekijät saavat ne lisääntymään ja niitä voidaan eristää verestä tai ottaa suoraan luuytimeästä. Muissa kudoksissa kantasolut ovat kudossolujen seassa yksittäisinä soluina. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2003.)

2.1.3 iPS-solut

Solujen erilaistumisen uskottiin pitkään olevan palautumaton tapahtuma. Vuonna 2006 japanilainen professori Sinya Yamanaka tutkimusryhmineen kuitenkin onnistui uudelleen ohjelmoimaan hiiren ihon fibroblastisoluja takaisin kantasoluiksi. Tutkimusryhmä tutki yhteensä 24 kantasoluissa esiintyvää geeniä ja havaitsivat, että näistä geeneistä neljän siirtäminen täysikasvuisen hiiren ihon fibroblasteihin riitti palauttamaan nämä solut alkion kantasolujen kaltaisiksi soluiksi. Nämä solut nimettiin indusoiduiksi kantasoluiksi eli iPS-soluiksi (engl. Induced Pluripotent Stem Cells).

(Takahashi & Yamanaka 2006.) Ihmisen soluilla sama pystyttiin tekemään vuotta myöhemmin, vuonna 2007 (Takahashi ym. 2007).

Indusoidut pluripotentit kantasolut (iPS) ovat siis kantasoluja, jotka on tuotettu somaattisista soluista uudelleen ohjelmoimalla ne takaisin pluripotentiksi kantasoluiksi (Nishikawa, Goldstein & Nierras 2008). iPS-solut ovat biologiselta toiminnaltaan, morfologialtaan ja geenien ilmentymiseltään alkion kantasolujen kaltaisia. Ne muistuttavat myös ulkomuodoltaan ja kasvutavoiltaan alkion kantasoluja. (Takahashi ym. 2007.)

iPS-soluja valmistetaan uudelleen ohjelmoimalla kohdesolut lisäämällä niihin neljä geeniä, jotka ovat Klf-4, Sox-2, Oct3/4 ja c-Myc (Takahashi & Yamanaka 2006). Näitä geenejä kutsutaan yhdessä Yamanaka-faktoreiksi menetelmän kehittäjän mukaan (Lehtinen & Aalto-Setälä 2012). Nämä geenit ilmentyvät kantasoluissa ja koodaavat pluripotenttiutta ylläpitäviä transkriptiofaktoreita, eli ylläpitävät solujen erilaistumattomuutta ja jakautumiskykyä (Takahashi & Yamanaka 2006). Ihmisen iPS-soluja valmistettaessa kohdesoluina käytetään yleisimmin ihobiopsiasta saatuja fibroblastisoluja (Takahashi ym. 2007) tai veren mononukleaarisia valkosoluja (Lehtinen & Aalto-Setälä 2012).

Geenien siirtämiseen kohdesoluihin käytetään geeninsiirtovektoreita (Takahashi & Yamanaka 2006). iPS-solujen valmistamisessa geeninsiirtovektoreina käytetään retro- ja sendaiviruksia. Nämä ovat muunneltuja viruksia, joiden genomista on poistettu replikaatiokykyyn vaikuttavat geenit, eli virukset eivät pysty lisääntymään eivätkä tuottamaan uusia viruksia infektoidussa solussa. (Lehtinen & Aalto-Setälä 2012.) Kun geenit on siirretty kohdesoluihin virusvektorien avulla, soluja kasvatetaan kuten alkion kantasoluja (Nishikawa, Goldstein & Nierras 2008). Viikon tai kahden kuluttua viljelmissä on havaittavissa ensimmäiset iPS-solukoloniat, ja noin neljän viikon kuluttua iPS-solut ovat valmiita poimittaviksi ja siirrettäviksi jatkoviljelyyn. (Lehtinen & Aalto-Setälä 2012.)

iPS-soluteknologian kehittäminen on mullistanut koko kantasolututkimuksen ja lisännyt merkittävästi sen soveltamismahdollisuuksia (Lehtinen & Aalto-Setälä 2012). Menetelmällä uskotaan olevan myös merkittävä vaikutus regeneratiiviseen lääketieteeseen (Nishikawa, Goldstein & Nierras 2008). iPS-soluista tehtyjä solumalleja

voidaan hyödyntää tutkittaessa sairauksien mekanismeja, tehtäessä lääketestauksia ja toksisuustestejä. (Takahashi ym. 2007.) Shinya Yamanaka palkittiinkin iPS-teknologian kehittämisestä sekä Millenium-palkinnolla että lääketieteen Nobelin palkinnolla vuonna 2012 (Lehtinen & Aalto-Setälä 2012). iPS-solujen käytöllä tutkimuksessa ei ole vastaavia eettisiä ongelmia kuin alkion kantasolujen käytöllä (Nishikawa, Goldstein & Nierras 2008). Lisäksi iPS-solujen avulla voidaan vähentää koe-eläinten käyttöä. (Lehtinen & Aalto-Setälä 2012.)

iPS-soluilla uskotaan olevan myös terapeuttisia mahdollisuuksia (Takahashi ym.2007). Potilaasta peräisin olevina soluina ne esimerkiksi poistaisivat kudosis- ja elinsiirrossa esiintyviä hylkimis- ja kudossopivuusongelmia (Nishikawa, Goldstein & Nierras 2008). Nykytekniikalla terapeuttinen käyttö ei kuitenkaan vielä ole mahdollista, johtuen virusvektorien ja onkogeenien aiheuttamasta terveysriskistä. Kehitystyö kuitenkin jatkuu, ja tulevaisuudessa todennäköisesti pystytään tuottamaan iPS-soluja tavalla, joka mahdollistaa turvallisen terapeuttisen käytön. (Lehtinen & Aalto-Setälä 2012.)

2.2 Kantasolujen viljely

Kantasoluviljelyn tarkoituksena on saada kantasolut pysymään elossa ja erilaistumattomina sekä jakaantumaan. Viljelyolosuhteiden tulee olla pluripotenttiutta ylläpitäviä, koska muuten kantasolut alkavat spontaanisti erilaistua. Perinteinen tapa viljellä kantasoluja on kasvattaa niitä hiiren alkion fibroblastien päällä (MEF, mouse embryonic fibroblasts). (Amit ym. 2005.) MEF-solukerroksen soluja kutsutaan tuki- eli feeder-soluiksi. Ne antavat kantasolujen tarvitseman solu-solu-kontaktin sekä erilaisia kasvutekijöitä ja solunulkoisia proteiineja, joita kantasolut tarvitsevat pysyäksään erilaistumattomina (Ojala ym. 2012). MEF-solujen käyttö feeder-soluina vaatii niiden inaktivoimista, eli jakautumisen pysäyttämistä. Tämä voidaan tehdä mitomysiini C-käsittelyllä tai säteilyttämällä (Conner 2001). Ravinteita kantasolut ja MEF-solut saavat mediumista, joka esimerkiksi sisältää naudan sikiön seerumia (engl. fetal bovine serum, FBS) (Amit ym. 2005).

Kantasolututkimuksen yhtenä tavoitteena on kantasolujen käyttö lääketieteellisissä sovelluksissa (BioMediTech). Eläinperäiset feeder-solut ja muut viljelyssä käytettävät eläinperäiset komponentit sisältävät eläinperäisiä proteiineja ja muita molekyylejä, jotka

voivat siirtyä kantasoluihin viljelyn aikana (Ojala ym.2012). Tämän vuoksi on pyritty kehittämään eläinperäistä materiaalia sisältämättömiä kasvatusmenetelmiä, jotta kantasolut olisivat soveltuvia lääketieteelliseen käyttöön tulevaisuudessa. Myös seerumin käytöstä mediumissa on pyritty eroon, koska vaikka seerumi olisi ihmisperäistä, se ei ole koostumukseltaan aina samanlaista, vaan sisältää vaihtelevia komponentteja.

Kantasolut tarvitsevat jonkinlaisen pinnan, johon ne voivat kiinnittyä pystyäkseen kasvamaan. Feeder-solukerros on pystytty onnistuneesti korvaamaan kaupallisella Matrigel-tuotteella, jolla solukasvatuskaivon pohja voidaan koutata. (Xu ym. 2001; Noggle ym. 2005.) Matrigel on hiiren kasvainsoluista eristettyä tyvikalvoa (BD Bioscience 2012), ja se sisältää lähinnä laminiinia, kollageeni IV:a ja heparaanisulfaatti-proteoglykaania (Xu ym. 2012). Myös solunulkoisia proteiineja, kuten laminiinia, kollageeni IV:a ja fibronectiiniä, on onnistuneesti käytetty feeder-solujen sijasta (Ojala ym. 2012).

Kantasolut tarvitsevat feeder-solujen tuottamia yhdisteitä pysyäkseen erilaistumattomina. Suora kontakti MEF-soluihin on vältetty käyttämällä MEF-soluilla konditioitua mediumia (Noggle ym. 2005). Tämä tarkoittaa, että ennen kantasoluille lisäämistä mediumia on pidetty noin neljän tunnin ajan MEF-soluviljelmässä, jolloin siihen on siirtynyt MEF-solujen erittämiä yhdisteitä (Xu ym. 2001). Konditoidun mediumin käytössä on kuitenkin ristikontaminaation vaara, koska se on kosketuksissa MEF-solujen kanssa (Noggle ym. 2005). Konditoidun mediumin lisäksi on mahdollista käyttää kaupallisesti saatavaa seerumitonta mediumia (SFM), joka sisältää ihmisestä peräisin olevia ja rekombinantti proteiineja sekä kasvutekijöitä (Li ym. 2005).

2.3 Sydämen kehitys ja solujen erilaistuminen

Sydän on ensimmäisiä kehittyviä elimiä selkärankaisten alkiossa (Mummery ym. 2012). Se alkaa kehittyä pian gastrulaation jälkeen, ja sykkiminen alkaa jo alkionkehityksen neljännellä viikolla (Paananen ym. 2006; Mummery ym. 2012). Gastrulaatiossa alkiolevyyn muodostuu kolme alkiokerrosta, jotka ovat endodermi, mesodermi ja ektodermi. Sydän alkaa kehittyä mesodermin soluista. (Paananen ym. 2006.)

Sydämen kehittyminen ja sydänsolujen esiasteet ovat suurimmaksi osaksi keskittyneet alkiojuosteen etuosaan. Osa esiastesoluista on jakautunut muualle alkiojuosteeseen niille paikoille, missä ne ovat myöhemmin kehittyvässä putkisydämessä. (Denning, Passier & Mummery 2005.) Nämä muualla olevat esiastesolut ovat kuitenkin yhteydessä alkiojuosteen etuosassa sijaitsevaan sydämen kehitystä ohjaavaan keskukseen (ns. solmu, engl. node). Kauimpana ohjauskeskuksesta olevat solut muodostavat eteiset, lähimpänä olevat solut muodostavat ulosvirtauskanavat, ja näiden välissä olevat solut muodostavat kammiot. (Denning ym. 2005.)

Kehityksen edetessä osa mesodermin esiastesoluista kulkeutuu alkiojuosteesta etu-sivusuuntaan, ja näin syntyvät sydänsoluja muodostavat alueet alkiojuosteen molemmille puolille (Denning ym. 2005). Alueille muodostuu kaksi endoteeliputkea, jotka myöhemmin sulautuvat yhteen muodostaen putkisydämen. Putkeen syntyy viisi lokeroa: kammion aihe, laskimopoukama, sydänekupula, eteinen ja valtimorunko. Tämä sydämen aihe taipuu ensin hevosenkenkämäiseksi ja sen jälkeen S-kirjaimen tapaan mutkalle. (Paananen ym. 2006.) Samalla sydän kiertyy oikealle, ja tulevan sydämen osaset asettuvat vähitellen kohdilleen (Denning ym. 2005; Paananen ym. 2006).

Sydämen kehitystä ohjaavat ympäröiviltä solupopulaatioilta saadut signaalit (Mummery ym. 2012). Tällä hetkellä tunnetaan kolme kasvutekijäryhmää, joilla on positiivisia tai negatiivisia vaikutuksia kardiogeneesiin. Nämä ovat luun morfogeeniset proteiinit eli BMP:t (bone morphogenetic proteins), wingless/INT-proteiinit eli WNT:t, ja fibroblasti kasvutekijät eli FGF:t (fibroblast growth factors). (Denning ym. 2005; Mummery ym. 2012.) Nämä kasvutekijät ja niiden inhibiittorit ilmentyvät endodermissä.

BMP-signaaliointi yleensä edistää kardiogeneesiä, samoin fibroblasti-kasvutekijät (Mummery ym. 2012). WNT-proteiinien toiminta on monimutkaisempaa ja vaikutukset kardiogeneesiin riippuvat signaaliointireitistä. WNT-proteiinien toiminta β -catenin/GSK3- reitin kautta inhiboi kardiogeneesiä, kun taas toiminta PKC/JNK-reitin (Protein kinase C/ c-Jun-N-terminal kinase) kautta edistää kardiogeneesiä. (Denning ym. 2005; Mummery ym. 2012.)

Kun mesodermin solut ovat saaneet tarvittavat signaalit, niiden genomissa aktivoituvat sydänsoluiksi erilaistumisessa tarvittavat geenit. Tällöin solut alkavat erilaistua ja ilmentää sydänsoluille tyypillisiä transkriptiotekijöitä (Denning ym. 2005; Mummery

ym. 2012). Esimerkiksi homeodomeeninen transkriptiotekijä Nkx2.5 ja T-box proteiini Tbx5 ovat ensimmäisiä sydänlinjan markkereita, jotka ilmentyvät kun sydänsoluja muodostavat alueet ovat syntyneet. Nkx2.5 ja Tbx5 toimivat yhdessä GATA-transkriptiotekijöiden ja seerumin vastetekijän (SRF) kanssa aktivoitakseen sydämen rakenteellisia geenejä, jotka tuottavat sydänsoluille tyypillisiä proteiineja, kuten aktiini, myosiinin raskas- ja kevytketju, troponiini ja desmiini. (Denning ym. 2005; Mummery ym. 2012.)

2.4 Sydänlihassolut

Sydänlihassolut muistuttavat poikkijuovaisia lihassoluja. Poikkijuovat johtuvat soluissa olevista supistuksen toiminnallisista yksiköistä eli sarkomeereistä (Kettunen, Hassinen, Peuhkurinen & Kupari 2008.) Sydänlihassolut ovat lyhyitä, 0,1- 0,5 mm pitkiä ja haarautuneita. Ne ovat liittyneet toisiinsa ja muodostavat tiiviin verkon. Niissä on yksi tai muutama tuma. Solujen kosketuspinnossa eli kytkeytyvyissä on ionikanavia, joiden kautta aktiopotentiaali leviää solusta toiseen. Tämä mahdollistaa impulssin nopean leviämisen koko sydänlihakseen. Sydänlihassolujen erityispiirre on, että ne kykenevät spontaaniin sykintään ilman ulkoisia ärsykeitä. (Bjälle ym. 1999.) Lisäksi niissä on huomattavan paljon mitokondrioita, noin 20-30 % solun tilavuudesta. Sydänsolujen aineenvaihdunta on jatkuvan supistelun vuoksi hyvin nopeaa, ja kutakin sarkomeeria kohden solussa on yleensä kaksi mitokondriota. (Kettunen, Hassinen, Peuhkurinen & Kupari 2008.)

Lihassolut rakentuvat tiiviisti pakkautuneista myofibrilleistä, jotka ovat solun päästä toiseen ulottuvia ohuita säikeitä (Kettunen, Hassinen, Peuhkurinen & Kupari 2008). Myofibrillit koostuvat aktiini- ja myosiinifilamenteista, jotka ovat asettuneet lomittain kahden Z-levyn väliin. Z-levyt ovat valkuaisaineverkkoja, joihin aktiinifilamentit ovat kiinnittyneet toisesta päästään. Kahden Z-levyn välistä aluetta kutsutaan sarkomeeriksi. Myosiinifilamentit ovat sarkomeerin keskellä. Aktiinifilamenttien toiset päät ovat kiinni Z-levyissä ja toiset vapaina keskellä sarkomeeriä. Sydänlihaksen supistuessa myosiini- ja aktiinifilamentit tarttuvat toisiinsa ja liukuvat toistensa ohi enemmän lomittain. Tämä saa sarkomeerin lyhenemään, ja kun solun kaikki sarkomeerit lyhenevät, koko solu lyhenee. (Bjälle ym. 1999.)

Sarkomeerin lyhenemiseen ja filamenttien toisiinsa tarttumiseen tarvitaan solun korkea Ca-ionipitoisuus (Kettunen, Hassinen, Peuhkurinen & Kupari 2008). Aktiopotentiaali alkaa solukalvolta, kun solun ulkoisesta tilasta virtaa Na^+ - ja Ca^{2+} -ioneita solun sisään. Aktiopotentiaali leviää solukalvolta syvemmälle solun sisään T-putkia pitkin. (Bjälle ym. 1999.) Tämä saa aikaan Ca^{2+} -ionien vapautumisen sarkoplasmakalvostosta, ja sarkomeerien supistuminen käynnistyy. Aktiopotentiaalin loputtua sarkoplasmakalvostossa olevat ionipumput keräävät Ca^{2+} -ioneita takaisin sarkoplasmakalvostoon ja supistuminen loppuu. Sydämessä supistelua säätelevät sinussolmuke ja johtoratajärjestelmän solut (Kettunen, Hassinen, Peuhkurinen & Kupari 2008.) Soluviljelmässä sykintä on spontaania (Kujala ym. 2012). Vierekkäiset sydänlihassolukoloniat saattavat kuitenkin tahdistaa toisiaan ja sykkiä samassa tahdissa.

2.5 Työssä käytetyissä solulinjoissa esiintyvät sydänsairaudet

Tässä työssä käytettiin solulinjoja, joissa esiintyi kolme erilaista perinnöllistä, vakavaa sydänsairautta. Linjat olivat iPS-solulinjoja, eli ne oli tehty sairautta sairastavan potilaan ihobiopsiasta muuntamalla solut takaisin kantasoluiksi. Näistä linjoista erilaistetuilla sydänlihassoluilla on siis kyseistä sairautta aiheuttavat geenimutaatiot, ja esimerkiksi niiden sykintä saattaa poiketa kontrollilinjana käytetyn terveen potilaan linjasta erilaistettujen sydänlihassolujen sykinnästä. (Venäläinen, henkilökohtainen tiedonanto 20.09.2013.) Työssä käytetyissä solulinjoissa esiintyvät sydänsairaudet ovat katekoliamiiniherkkä monimuotoinen kammiotieälyöntisyys, eli CPVT (engl. catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia), hypertrofinen kammiomyopatia, eli HCM (engl. hypertrophic cardiomyopatia) ja pitkä QT-oireyhtymä, eli LQT1 (engl. long QT-syndrome)

Sydänsairauksien tutkimuksessa ongelmana on aikaisemmin ollut sopivien sydäntautimallien puute. iPS-soluteknologian kehittymisen myötä on tullut mahdolliseksi valmistaa sydänlihassoluja ihmisen kantasoluista ilman alkionkantasolujen käyttöön liittyviä eettisiä ongelmia. Näin saatuja sydänlihassoluja voidaan kasvattaa ja ylläpitää soluviljelmissä pitkiäkin aikoja. (Lehtinen & Aalto-Setälä 2012.) iPS-soluista valmistetut sydänlihassolut sykkivät spontaanisti, ilmentävät sydänlihassoluille tyypillisiä markkereita ja ovat elektrofysiologisilta toiminnoiltaan sydänlihassolujen kaltaisia (Kujala ym. 2012). Lisäksi iPS-soluista valmistetut

sydänsolut reagoivat lääkeaineisiin sydänlihassoluille tyypillisellä tavalla. (Lehtinen & Aalto-Setälä 2012.) iPS-solutekniikan avulla on myös mahdollista valmistaa sydänlihassoluja geneettistä sydänsairautta kantavan henkilön fibroblastisoluista (Kujala ym. 2012). Näin tuotetuilla sydänlihassoluilla on myös sairauden aiheuttava geenivirhe. Näiden solumallien avulla voidaan tutkia sydämen ja sydänsolujen kehitystä ja toimintaa sekä sitä, miten geenivirhe vaikuttaa solujen toimintaan. Lisäksi solumalleja voidaan käyttää lääketestaukseen, uusien lääkkeiden kehittämiseen sekä potilaan yksilöllisen lääkehoidon suunnitteluun. (Lehtinen & Aalto-Setälä 2012.)

2.5.1 Katekoliamiiniherkkä monimuotoinen kammiothälyöntisyys

Katekoliamiiniherkkä monimuotoinen kammiothälyöntisyys, eli CPVT, on harvinainen, pahanlaatuinen rytmihäiriösairaus. Sairaus on perinnöllinen, ja se johtuu sydämen sähköisen toiminnan poikkeavuudesta. (Suomen Sydänliitto ry.) Rakenteellisia poikkeavuuksia sydämessä ei ole havaittu (Kujala ym. 2012). CPVT:n oireita ovat rasituksen aiheuttamat rytmihäiriöt, jotka voivat johtaa tajuttomuuskohtaukseen tai jopa äkkikuolemaan. Rytmihäiriön voi aiheuttaa sekä fyysinen että psyykinen rasitus. (Suomen Sydänliitto ry.)

Suomessa CPVT tapauksia on runsaat sata. Oireet alkavat yleensä kouluiässä tai nuoruudessa. (Suomen Sydänliitto ry.) Kolmeenkymmeneen ikävuoteen mennessä kuolleisuus on 30-35 % (Kujala ym. 2012). Diagnosoinnissa käytetään rasituksen aikana mitattua EKG-tutkimusta, jossa rytmihäiriöt havaitaan. Oireet aiheutuvat sydänlihassolujen kalsiumaineenvaihdunnan häiriöstä. Rasituksen aikana kalsiumia vapautuu poikkeavasti solunsisäisistä varastoista, mikä aiheuttaa rytmihäiriön. Sairauteen liittyviä geenejä tunnetaan kaksi, joissa kummassakin on havaittu useita mutaatioita. Muitakin CPVT:tä aiheuttavia ja siihen liittyviä geenejä saattaa olla, mutta niitä ei vielä tunneta. Tunnetuista geeneistä RYR2-geenipuutokset periytyvät vallitsevasti ja kalsekvestriinigeenin peittyvästi. (Suomen Sydänliitto ry.)

CPVT-potilaita voidaan lääkittää beetasalpaajalääkityksellä ja vakavissa tapauksissa (elvytetyillä potilailla) voidaan käyttää rytmihäiriötahdistinta. Potilaiden tulee välttää voimakasta fyysistä rasitusta, urheilua, uimista, äkillistä pelästymistä sekä kofeiinia. (Suomen Sydänliitto ry.)

2.5.2 Hypertrofinen kardiomyopatia

Hypertrofinen kardiomyopatia, eli HCM, on yleisin alle 35-vuotiaiden äkkikuolemien syy länsimaissa (Lindgren 2002). Sairauden esiintyvyydeksi arvioidaan 1/500, joten se on yleisin perinnöllinen sydänsairaus (Kuusisto 2010). HCM periytyy autosomaalisesti dominantisti (Lindgren 2002). Suomessa sairautta aiheuttavat yleisimmin kaksi valtamutaatiota myosiinia sitovassa proteiini C- ja α -tropomyosiini-geeneissä. Kaikkiaan tunnetaan 450 tautia aiheuttavaa mutaatiota 10:ssä eri geenissä. Nämä selittävät yhteensä noin 40 % tautitapauksista. (Kuusisto 2010.)

Hypertrofisessa kardiomyopatiassa vasemman kammion seinämät paksuuntuvat (>15 mm). Paksuuntuminen johtuu nykyäsityksen mukaan sarkomeerin proteiineja koodaavien geenien mutaatioista. (Lindgren 2002.) Mutaatioiden johdosta poikkeava proteiini sitoutuu sarkomeeriin tai proteiinia syntyy liian vähän, mikä haittaa sarkomeerin normaalia toimintaa ja rakennetta. Tämä johtaa sarkomeerin supistuvuuden muutoksiin ja sydänlihaksen paksuuntumiseen. Paksuuntumisen lisäksi saattaa esiintyä sydänlihaksen jäykkyyttä, mikä vaikeuttaa sydämen täyttymistä verellä, ja osalla potilaista myös ulosvirtauskanavan ahtautta. (Kuusisto 2010.)

Hypertrofiselle kardiomyopatialle on ominaista hyvin vaihteleva taudinkuva. Yleensä paksuuntuminen alkaa murrosiässä, mutta vaikeissa tapauksissa paksuuntuminen alkaa jo lapsuudessa. (Kuusisto 2010.) Sairauden aiheuttava geeni vaikuttaa sairauden vaikeusasteeseen (Kuusisto 2010). HCM-potilaan oireet vaihtelevat oireettomuudesta vaikeisiin sydämen vajaatoiminta- ja rytmihäiriöoireisiin, sekä äkkikuolemiin (Lindgren 2002; Kuusisto 2010). Vaikka oireita on hyvin eritasoisia, yleisimpinä voidaan mainita hengenahdistus rasituksessa, heikentynyt rasituksen sieto, rytmihäiriöt ja tajunnan häiriöt. Oireileville potilailla voidaan määrätä beeta- tai kalsiumsalpaajalääkitys. (Kuusisto 2010.)

2.5.3 Pitkä QT-oireyhtymä

Pitkä QT-oireyhtymä, eli LQTS, on sydämen sähköisen toiminnan poikkeama, joka altistaa vakaville rytmihäiriöille (Lahti ym. 2012). Rytmihäiriöiden seurauksena saattaa olla äkillinen tajunnan menetys tai joka äkkikuolema. Pitkästä QT-oireyhtymästä

tunnetaan toistakymmentä erilaista alatyyppeä, jotka erotellaan toisistaan aiheuttavan geenin perusteella. Yleisimmät muodot ovat LQT1, LQT2 ja LQT3. LQTS:aa esiintyy Suomessa yhdellä ihmisellä 300:sta. (Suomen Sydänliitto ry. 2010.)

Pitkässä QT- oireyhtymässä QT- aika EKG-käyrässä on poikkeavan pitkä (Lahti ym. 2012). Tämä johtuu geenivirheen aiheuttamasta poikkeavuudesta ionikanavien rakenteessa tai ionikanavien vähäisestä määrästä. Tällöin kalium- ja natriumionien kulkeutuminen solukalvon läpi muuttuu ja ionien palautuminen hidastuu, sekä sydänsolujen sähköinen palautumisaika pitenee. Tämä altistaa rytmihäiriöille, mutta ei aiheuta niitä. LQT1:n ollessa kyseessä rytmihäiriö ilmenee tyypillisesti voimakkaan fyysisen rasituksen tai uimisen yhteydessä. (Suomen Sydänliitto ry. 2010.)

Pitkä QT-oireyhtymä on yleensä perinnöllinen sairaus, mutta voi ilmetä myös jonkin laukaisevan tekijän vuoksi (Lahti ym. 2012). Aiheuttajia (ilman perinnöllisyyttä) saattavat olla esimerkiksi jokin lääkeaine, veren suolatasapainon häiriö tai sydänlihaksen hapenpuute. Perinnöllinen pitkä QT-oireyhtymä periytyy suurin piirtein joka toiselle lapselle. Mahdollisuus on siis 50 % jokaisessa raskaudessa. Mikäli sairaus periytyy molemmilta vanhemmilta, rytmihäiriöiden riski on huomattavasti suurempi. (Suomen Sydänliitto ry. 2010.) Monet taudin kantajista ovat oireettomia (Lahti ym. 2012). Noin joka neljäs tai joka toinen kantajista saa elämänsä aikana oireyhtymään liittyviä rytmihäiriöitä. Hoitona käytetään rytmihäiriöitä aiheuttavien tekijöiden välttämistä, lääkehoitoa ja erityisen suuren riskin potilailla sydämenrytmihäiriötahdistinta. (Suomen Sydänliitto ry. 2010.)

2.6 Kantasolujen erilaistusmenetelmät

Kantasolujen erilaistamiseen sydänlihasoluiksi käytetään yleisesti END2-menetelmää, jossa solut erilaistetaan hiiren viskeraalis-endodermaalisten solujen päällä (Mummery ym. 2012). Toinen käytetty menetelmä on EB-menetelmä, jossa solut muodostavat suspensiossa soluaggregaatteja ja erilaistuvat spontaanisti kaikkiin kolmeen alkiokerrokseen, siis myös sydänlihasoluiksi (Amit ym. 2005). Uusina menetelminä on kehitetty feeder-free-menetelmiä, joissa pyritään täysin määriteltyihin ja tunnettuihin erilaistusolosuhteisiin, sekä eroon eläinperäisestä materiaalista (Skottman & Hovatta 2006). END2- ja EB-menetelmillä tuotetut sydänlihasolut eivät sovellu terapeuttisiin

sovelluksiin, koska niiden sisältämät eläinperäiset materiaalit saattavat sisältää patogeeneja ja erilaistuksen olosuhteet eivät ole tarkasti tiedossa.

Regeneratiivisen lääketieteen tavoitteena on tuottaa soluja terapeuttisiin tarkoituksiin (BioMediTech). Siksi feeder-free menetelmien kehittäminen on tällä hetkellä yksi alan tärkeimmistä tutkimuskohteista. Muutamia feeder-free-menetelmiä on jo kehitetty, mutta niiden ongelmana on menetelmien herkkyyks pienillekin muutoksille vaikuttavien reagenssien pitoisuuksissa, vaikutusajoissa sekä reagenssien lisäysten ja poistojen ajankohdissa (Mummery ym. 2012). Lisäksi feeder-free-menetelmiä käytettäessä on havaittu muita menetelmiä enemmän solujen karyotyyppimuutoksia (Draper ym. 2004). Tästä syystä tutkimuksessa käytetään yleensä END2- tai EB-menetelmiä sydänlihassolujen tuottamisessa tutkimuskäyttöön. (Venäläinen, henkilökohtainen tiedonanto 16.09.2013.)

2.6.1 END2-menetelmä

END2-menetelmässä kantasoluja kasvatetaan hiiren viskeraalis-endodermaalisten solujen (END-2) päällä (Rajala, Pekkanen-Mattila & Aalto-Setälä 2011). Viskeraalisella endodermillä on tärkeä rooli sydämen esisolujen muodostumisessa alkionkehityksen aikana. (Mummery ym. 2003.) Samoin viskeraalis-endodermaalisten solujen läsnäolo ja niiden erittämät viestiaineet saavat kantasolut erilaistumaan sydänsoluiksi myös soluviljelmässä, vaikka vaikutusmekanismeja ei tarkasti tunneta (Rajala, Pekkanen-Mattila & Aalto-Setälä 2011; Mummery ym. 2012).

END2-menetelmässä täyteen kasvanutta END2-maljaa käsitellään ensin kolmen tunnin ajan mitomysiini C:llä, joka lopettaa solujen jakautumisen. MEF-solujen päällä kasvaneet kantasolut siirretään kasvamaan käsiteltyjen END2-solujen päälle. (Mummery ym. 2003.) END2-solut antavat kantasoluille tarvittavat signaalit sydänlihassoluiksi erilaistumiseen, ja sykkiviä kolonioita voidaan havaita jo viidentenä päivänä (Mummery ym. 2012). Kehittyneitä sykkiviä aggregaatteja voidaan dissosoida kollageenaasilla ja siirtää gelatiinilla koutatuille peitinlaseille jatkotutkimuksia varten. Lisäksi sykkiviä soluaggregaatteja voidaan pakastaa, ja sulatuksen jälkeen osa niistä alkaa sykkiä uudelleen. (Mummery ym. 2003.) Menetelmän heikkoutena on erilaistuvien sydänlihassolujen vähäinen määrä (2-3 %). Tutkimuksissa on havaittu

sydänsolujen määrän kasvavan (25 %), mikäli erilaistuksessa käytetty medium on kokonaan seerumiton ja insuliiniton. (Mummery ym. 2012.)

2.6.2 EB-menetelmä

Kun kantasolut poistetaan pluripotenttiutta ylläpitävistä kasvatusolosuhteista, ne alkavat spontaanisti erilaistua. EB-menetelmässä kantasoluja kasvatetaan suspensiossa, jossa ne muodostavat soluaggregaatteja. Näissä soluaggregaateissa kantasolut alkavat spontaanisti erilaistua kaikkiin kolmeen alkiokerrokseen. (Amit ym. 2005; Mummery ym. 2012.) Näitä soluaggregaatteja kutsutaan englanniksi nimellä embryoid bodies, eli EB:t (Amit ym. 2005). Suspensiokasvatuksen jälkeen EB-aggregaatit pleitataan 0,1 % gelatiinilla koutattuihin kaivoihin (Mummery ym. 2012).

Solut erilaistuvat spontaanisti kaikkiin solutyyppeihin kolmessa eri alkiokerroksessa, myös sydänsoluiksi. Sydänsolut sijaitsevat kehittyvässä EB-aggregaatissa epiteelikerroksen ja mesenkymaalisten solujen tyvisolukerroksen välissä. (Boheler ym. 2002). Sydänsolut on helppo identifioida EB-aggregaatista, sillä ne sykkivät spontaanisti 1-4 päivän kuluttua pleittauksesta (Boheler ym. 2002; Mummery ym. 2012). Sykkivien pesäkkeiden on havaittu lisääntyvän erilaistuksen edetessä. Sykkivät solut sykkivät useasta päivästä aina kuukauteen asti. (Boheler ym. 2002.) Täysin erilaistuneet solut eivät enää syki, mutta niitä voidaan ylläpitää useita viikkoja (Boheler ym. 2002). Sykkimisen lisäksi EB-menetelmällä tuotettujen sydänsolujen geeniekspressio on sydänsoluille tyypillinen, niillä on myofilamenttien proteiineja ja elektronimikroskoopilla on havaittu sarkomeerien järjestäytymisen olevan tyypillinen kehittyville sydänsoluille. Lisäksi soluista on mitattu spontaaneja aktipotentiaaleja. (Mummery ym. 2012.)

EB-menetelmän ongelmina ovat EB-aggregaattien vaihteleva koko, rakenne ja koostumus. Lisäksi sydänlihassolujen määrä aggregaateissa on hyvin vähäinen. (Boheler ym. 2002; Mummery ym. 2012.) Tämän vuoksi on kehitetty menetelmiä, joilla sydänsolujen määrää voitaisiin lisätä ja aggregaattien kokoa säädellä. On havaittu, että 4-6 päivän ikäisen EB-aggregaatin käsittely 5-aza-2'-deoksisytidiinillä lisäisi sydänsolujen määrää aggregaatissa (Boheler ym. 2002). Aggregaattien kokoa voidaan säädellä sentrifugoimalla haluttu solumäärä U- tai V-mallisiin kaivoihin. Sentrifugointi

muodostaa soluista aggregaatin kaivon pohjalle. (Mummery ym. 2012.) Tällä tavoin saadaan tasaisen kokoisia aggregaatteja ja aggregaattien kokoa voidaan säädellä muuttamalla solumäärää (Mummery ym. 2012.)

2.6.3 Feeder-free-menetelmät

Feeder-free-erilaistuksessa, eli menetelmissä, joissa ei käytetä tukisoluja, voidaan käyttää joko kasvutekijöitä tai kardiogeneesiin vaikuttavia pieniä molekyylejä (Xu 2012). Kasvutekijöillä erilaistettaessa riittää kaksi kasvutekijää, jotka ovat aktiivin A ja luun morfogeeninen proteiini 4, eli BMP4 (Rajala, Pekkanen-Mattila & Aalto-Setälä 2011). Transformoivan kasvutekijä β -ryhmän, eli TGF β -kasvutekijäryhmän (engl. transforming growth factor β), jäsenillä tiedetään olevan tärkeä merkitys alkion kehityksen aikana mesodermin induktiossa ja kardiogeneesissä. Sekä aktiivin A että BMP4 ovat kyseisen kasvutekijäryhmän jäseniä. (Xu 2012.)

Erilaistuksen aluksi kantasoluja pidetään kasvatusmediumissa viikon ajan. Sen jälkeen niitä käsitellään aktiivin A:lla yhden päivän ajan ja lopuksi BMP4:llä neljän päivän ajan. Aktiivin A käsittelyn jälkeen kuudentena päivänä solut ilmentävät Nkx2.5-markkeria. Sydänsolujen esiasteita voidaan havaita runsaasti päivän 8 tienoilla. (Xu 2012.) Päivänä 10 voidaan havaita spontaanisti sykkiviä solukolonioita (Rajala ym. 2011). Erilaistuneita soluja voidaan ylläpitää seerumittomassa mediumissa 2-3 viikkoa. Tällä menetelmällä voidaan saada n. 30 % sydänlihassoluja. (Xu 2012; Rajala ym. 2011.) Lisäksi menetelmä soveltuu sekä alkion kantasoluille, että iPS-soluille (Xu 2012).

Toisessa kasvutekijämenetelmässä käytetään viiden kasvutekijän yhdistelmää seerumivapaassa mediumissa. Oleellista menetelmässä on lisätä kasvutekijöitä soluille tietyissä aikapisteissä. Päivinä 1-4 soluja käsitellään kasvutekijöillä aktiivin A, BMP4 ja bFGF (basic fibroblast growth factor). Nämä kasvutekijät indusoivat mesodermiä. Tämän jälkeen soluja käsitellään Dickkopf:n Wnt-signalointireitin inhibiittori 1:llä, eli DKK1:llä (engl. Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1 (GeneGards® 2013)), ja verisuonten endoteelin kasvutekijällä, eli VEGF:llä (engl. vascular endothelial growth factor (Ferrera, Gerber & LeCounter 2003)), päivinä 4-8. Kasvutekijöiden lisäksi soluja pidetään vähähappisissa oloissa ensimmäiset 10-12 päivää. Tällä menetelmällä sydänsoluja voidaan saada 40 % kaikista soluista. (Xu 2012.)

Kasvutekijöiden lisäksi kantasoluja voidaan erilaistaa sydänlihassoluiksi käyttämällä kardiogeneesiin vaikuttavia pieniä molekyyliä. Useiden Wnt-signaalointireitin inhibiittoreiden on havaittu edistävän erilaistumista. Muitakin pienmolekyyliä on käytetty, esimerkiksi p38 mitogeeni-aktivoituneen proteiinkinasiinin (MAP) inhibiittoreita. (Xu 2012.) Tässä opinnäytetyössä käytetty erilaistusmenetelmä erilaistaa solut käyttämällä pienmolekyyliä ja hyödyntää muun muassa Wnt-signaalointireitin inhibiittoria. Pienmolekyylierilaistusmenetelmää on esitelty tarkemmin kappaleessa 4.5 sivulla 27.

3 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE JA TARKOITUS

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää mahdollisia linjakohtaisia eroja sydänerilaistustehokkuudessa käytettäessä pienmolekyylierilaistusmenetelmää. Linjakohtaisten erojen tietäminen helpottaa tutkimusryhmän töiden suunnittelua ja käytettävän solulinjan valintaa.

Tarkoituksena oli erilaistaa neljä iPS-solulinjaa pienmolekyylierilaistusmenetelmällä sydänlihassoluiksi eri solumäärillä, karakterisoida niitä, ja verrata tuloksia keskenään. Oletuksena oli, että linjojen välillä on eroa, koska aikaisemmissa tutkimuksissa on havaittu käytettävän linjan vaikuttavan erilaistumiseen (Xu 2012). Pienmolekyylierilaistusmenetelmässä käytettävää solumäärää optimoitiin testaamalla kolmea eri solumäärää. Solujen erilaistumistehokkuutta tutkittiin immunovärjäyksillä ja Cytospin-menetelmällä. Lisäksi erilaistumattomia soluja pakastettiin ja sulatuksen jälkeen testattiin erilaistumista. Jokainen linja erilaistettiin kolme kertaa pienmolekyylierilaistusmenetelmällä. Jokaista erilaistuskertaa havainnoitiin mikroskopoimalla sykkiviä soluja. Ensimmäisestä ja/tai toisesta erilaistuskerrasta tehtiin immunovärjäykset ja viimeisistä, eli kolmansista, erilaistuskerroista laskettiin erilaistumistehokkuudet Cytospin-menetelmällä.

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1 Työssä käytetyt solulinjat

Kaikki työssä käytetyt solulinjat ovat Sydänryhmän valmistamia iPS-solulinjoja. UTA.04602.WT on kontrollilinja, joka on tehty terveeseen ihmiseen fibroblastisoluista. UTA.05503.CPVT- , UTA.00102.LQT1- ja UTA.02912.HCMTs- linjat on tehty perinnöllisiä sydänsairauksia sairastavien henkilöiden fibroblastisoluista. Kunkin linjan solujen genomi on siis erilainen ja niissä on sydämen toimintaan vaikuttavia geenivirheitä. (Venäläinen, henkilökohtainen tiedonanto 20.09.2013.)

4.2 Kantasolujen viljely

Aluksi kantasoluja oli viljelty MEF-feedersolujen päällä. Siirrettäessä kantasolut feeder-free-viljelyyn MEF-solut raaputettiin pois pipetinkärjellä ja vanha medium imettiin pois. Tämän jälkeen lisättiin 1 ml Verseneä/kaivo ja kuoppalevyä inkuboituihin 4 minuuttia +37 asteessa. Versene on EDTA-liuos, joka on hellävarainen ja ei-entsymaattinen solujen dissosiaatioliuos (Life TechnologiesTM). Käsittelyn jälkeen Versene imettiin pois ja tilalle lisättiin 3 ml mTeSRTM1-mediumia, jolla solut purskuteltiin irti pohjasta. Versene-käsittely irrottaa solut sekä pohjasta että toisistaan, ja tuloksena on yksisolu-liuos. Koutattuihin 6-kuoppalevyn kaivoihin laitettiin valmiiksi 1 ml mTeSRTM1-mediumia ja 1 µl ROCK-inhibiittoria, jonka pitoisuus kaivoissa tulee olemaan 5 µM. ROCK-inhibiittori on dihydrokloridia, joka on selektiivinen inhibiittori Rho-assosioituneelle proteiinikinaasi p160ROCK:lle (Tocris Bioscience). Se parantaa solujen selviytymistä pakastuksesta ja jakamisesta. (Watanabe ym. 2007; Tocris Bioscience). Kuhunkin kaivoon laitettiin 1 ml solususpensiota.

Erilaistumattomia kantasoluja viljeltiin siis feeder-free-olosuhteissa 6-kuoppalevyillä, joiden kaivojen pohjat oli koutattu feeder-free-kouttausaineella. Mediumina kantasoluilla oli mTeSRTM1-medium, johon oli lisätty penisilliini/streptomysiini-antibioottiseosta. Feeder-free-olosuhteisiin siirron jälkeisenä päivänä kaivojen medium vaihdettiin kokonaan (4 ml mTeSRTM1) uuteen, jotta ROCK-inhibiittori saatiin kaivoista pois. Tämän jälkeen mediumista vaihdettiin puolet uuteen joka toinen päivä.

Solujen kasvu tarkastettiin päivittäin mikroskoopilla ja solut jaettiin, kun kaivot olivat lähes konfluenteja.

Kantasolujen viljelyssä käytetty mTeSRTM1 (STEMCELLTM Technologies) on seerumiton medium, jonka koostumus on tarkkaan määritelty. Se ylläpitää kantasolujen jakautumiskykyä ja pluripotenttiutta. mTeSRTM1 soveltuu ihmisen alkion kantasolujen ja iPS-solujen pitkäaikaiseen viljelyyn feeder-free-olosuhteissa ja myös iPS-solujen valmistamiseen feeder-free-olosuhteissa. Valmistajan tutkimuksien mukaan mTeSRTM1-mediumilla viljeltyt kantasolut ovat fenotyypiltään tasaisia ja karyotyypiltään normaaleja. Lisäksi ne ilmentävät pluripotenssimarkkereita ja ovat erilaistettavissa toiminnallisiksi erilaistuneiksi soluiksi. mTeSRTM1 sisältää naudan albumiinia sekä kasvutekijöinä rekombinantti ihmisen perus fibroblasti kasvutekijä, eli bFGF (engl. basic fibroblast growth factor), ja transformoivaa kasvutekijä β , eli TGF β (engl. transforming growth factor β). Nämä kasvutekijät ylläpitävät solujen erilaistumattomuutta. (STEMCELLTM Technologies 2012.)

Valmis mTeSRTM1-medium koostuu mTeSRTM1 5X Supplementista (100 ml) ja mTeSRTM1- perusmediumista (Basal Medium, 400 ml). Ohjeen mukaan supplementti tulee sulattaa huoneen lämmössä ja lisätä kokonaisuudessaan perusmediumiin. Lopputilavuus on 500 ml. Valmis medium säilyy 2-8°C kaksi viikkoa ja jäädytettynä -20 asteeseen 6 kuukautta. (STEMCELLTM Technologies 2012.) Työssä käytetty mTeSRTM1-medium oli valmistettu ohjeen mukaan, mutta siihen oli vielä lisätty 2,5 ml penisilliini/streptomysiini-antibioottivalmistetta.

4.3 Kantasolujen jakaminen

Kun 6-kuoppalevyjen kaivot olivat lähes konfluenteja, ne jaettiin yleensä 1:6-jaolla. Riippuen silmämääräisestä solumäärästä kaivoissa ja halutusta solutiheydestä, saatettiin tarvittaessa käyttää muutakin jakosuhdetta. Vanha medium imettiin ensin pois ja tilalle lisättiin 1 ml Verseneä/kaivo. Kuoppalevyä inkuboitiin 4 min +37 asteessa. Inkuboinnin aikana rapsuteltiin tarvittaessa pipetinkärjellä mahdollisia erilaistuneita kohtia pois mikroskoopin alla. Inkuboinnin jälkeen Versene poistettiin varovaisesti kaivoista ja lisättiin 3 ml mTeSRTM1-mediumia, jolla purskuteltiin solut irti.

Uudelle koutatulle kuoppalevylle lisättiin 1,5 ml mTeSRTM1-mediumia ja 1 µl ROCK-inhibiittoria jokaiseen kaivoon. ROCK-inhibiittorin lopullinen pitoisuus oli 5µM. Solususpensiota lisättiin 0,5 jokaiseen kaivoon. Jaon jälkeisenä päivänä medium vaihdettiin kokonaan uuteen, 4 ml mTeSRTM1-mediumia/kaivo, jotta ROCK-inhibiittori saatiin pois kaivoista. Tämän jälkeen mediumista vaihdettiin puolet joka toinen päivä.

4.4 Kantasolujen pakastaminen ja sulatus

Kantasolujen pakastaminen on välttämätöntä niiden säilyttämisen kannalta, mutta pakastus on soluille stressitekijä (Xu ym. 2001) ja pakastaminen saattaa aiheuttaa karyotyypimuutoksia soluihin (Venäläinen, henkilökohtainen tiedonanto 16.12.2013). Työssä testattiin pakastuksen ja sulatuksen vaikutusta erilaistumiseen. Kutakin kantasolulinjaa pakastettiin ja niitä säilytettiin nestetyypipakastimen kaasufaasissa. Sulatuksen jälkeen ne erilaistettiin pienmoleyylierilaistusmenetelmällä.

Pakastuksessa käytettiin solujen selviytymistä parantavaa pakastusliuosta, jossa oli 90 % FBS, 10 % DMSO ja 5 µM ROCK-inhibiittoria. Tätä liuosta laitettiin kuhunkin pakastusputkeen 0,5 ml, mutta DMSO:n ja ROCK-inhibiittorin pitoisuudet oli laskettava putken lopullista tilavuutta varten, joka oli 1,0 ml. Yhteen putkeen DMSO:ta tarvittiin siis 100 µl ja ROCK-inhibiittoria 0,5 µl. Loput, eli 899,5 µl, putken sisällöstä oli FBS:ää. Pakastusputkeen laitettiin valmiiksi DMSO, ROCK-inhibiittori ja puolet FBS:stä. Solut irrotettiin Versene-käsittelyllä ja purskuteltiin irti pohjasta 3 millilitralla FBS. Tämän jälkeen soluja kerättiin mahdollisimman paljon 0,5 millilitraan FBS:ää ja siirrettiin pakastusputkeen. Yleensä tehtiin yhdestä 6-kuoppalevyn kaivosta yksi pakastusputki.

Sulatuksessa pakastusputkien pohjia lämmitettiin vesihauteessa. Koutattuihin 6-kuoppalevyn kaivoihin laitettiin valmiiksi 2 ml mTeSRTM1-mediumia ja 1 µl ROCK-inhibiittoria (lopullinen pitoisuus 5µM). Yhtä pakastusputkea varten valmisteltiin kaksi kaivoa. Vesihauteessa olleeseen pakastusputkeen lisättiin 1 ml mediumia kaivosta hitaasti ja samalla sekoittaen. Tämän jälkeen koko putken sisältö siirrettiin 6-kuoppalevyn kaivoon. Kaivosta kerättiin mahdollisimman paljon soluja mahdollisimman pieneen medium-määrään pipetillä ja siirrettiin toiseen kaivoon. Tällä tavalla jokaisesta pakastusputkesta saatiin ns. puhdas ja likainen kaivo. Likaisessa

kaivossa oli pakastusliuosta ja vähemmän soluja, ja puhtaammassa kaivossa oli enemmän soluja. Sulatuksen jälkeen yleensä puhdas kaivo kasvoi paremmin, ja sitä lähdettiin viljelemään ja jakamaan kuten kappaleissa 4.2 ja 4.3 on esitetty (sivut 24 ja 25).

4.5 Pienmolekyylierilaistusmenetelmä

Pienmolekyylierilaistusmenetelmä on vapaa kasvutekijöistä, ja se soveltuu kaikille olemassa oleville ihmisen pluripotentille kantasolulinjoille. Menetelmä on esitelty Xiaojun Lian ym. (2013) artikkelissa ”Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions”. Menetelmässä kantasolut erilaistetaan sydänlihassoluiksi täysin määritellyissä ja tunnetuissa olosuhteissa. Se on siis feeder-free-menetelmä. Artikkelin mukainen sydänlihassolujen saanto tällä menetelmällä olisi 82-98 %.

Kuten aikaisemmin sydämenkehitystä käsittelevässä kappaleessa kerrottiin, Wnt-proteiinien vaikutus sydänerilaistumiseen on riippuvainen vaikuttavasta signalointireitistä. Lisäksi sydänerilaistukseen vaikuttaa signalointireitin toiminnan ajankohta. Alkion kehityksen aikana Wnt/ β -catenin-signalointireitti edistää sydänerilaistusta ennen gastrulaatiota, mutta sen jälkeen estää sitä (Ueno ym. 2007). Signalointireitin inhibointi on siis tarpeen erilaistuksen loppupuolella. Lisäksi Lian ym. (2013) ovat havainneet, että kantasolujen esikäsittely Gsk3-inhibiittorilla tehostaa sydänerilaistusta. Pienmolekyylierilaistusmenetelmässä hyödynnetään näitä molempia havaintoja. Kantasolut esikäsitellään ensin Gsk3-inhibiittorilla CHIR99021, ja myöhemmin Wnt/ β -catenin-signalointireitin inhibointiin käytetään sen inhibiittoria IWP4.

Pienmolekyylierilaistusmenetelmässä käytetään mediumina RPMI/B27-mediumia. B27 on seerumiton lisäravinne solujen viljelyyn. Se sisältää mm. A vitamiinia, antioksidantteja ja insuliinia. Alun perin B27 on kehitetty neurosolujen ylläpitoon, mutta se toimii myös sydänerilaistuksessa. Saatavilla on insuliinia sisältävä versio ja insuliiniton versio. (Life TechnologiesTM.) Insuliinin on havaittu inhihoivan sydänerilaistusta ensimmäisen viiden päivän aikana, joten erilaistuksen aikana käytetään

insuliinitonta B27:a ja erilaistuksen jälkeen ylläpitomediumissa insuliinia sisältävää B27:a (Lian ym.2013).

Menetelmällä on tavoitteena saada aikaiseksi yksisolukerroksinen, eli monolayer, solumatto. Ideaalitulanteessa solumatto peittää koko kaivon, ja solut sykkivät yhdessä samassa rytmissä. Solut ovat hyvin heikosti kiinnittyneet kaivojen pohjaan ja irtoavat helposti (Lian ym. 2013). Tästä syystä kuoppalevyjen käsittelyssä ja mediumien vaihdoissa on oltava hyvin varovainen.

Erilaistusprotokolla aloitetaan päivästä -4 jakamalla 6-kuoppalevyllä kasvaneet kantasolut 12-kuoppalevyille, kun kaivot ovat lähes konfluentteja. Vanha medium imettiin pois 6-kuoppalevyn kaivoista ja lisättiin 1 ml Accutacea/kaivo. Accutace on entsyymivalmiste, jolla on proteolyyttistä ja kollagenolyyttistä aktiivisuutta. Se on hellävarainen ja soveltuu herkkien solujen irrottamiseen kaivon pohjasta. (Life Technologies™.) Accutacen annetaan vaikuttaa 8 minuuttia +37 asteessa. Tämän jälkeen lisätään 1 ml mTeSR™1-mediumia per kaivo ja purskutellaan solut irti. Kaikki solut kerätään yhteen 15 ml:n falcon-putkeen ja solumäärä lasketaan. Saadun tuloksen perusteella laskettiin tarvittavat laimennoslaskut. Artikkelin perusteella solumäärä on kriittinen erilaistumisen onnistumisen kannalta, ja se tulisi optimoida solulinjoille erikseen. Artikkelin antaman ohjeen mukaan solumäärä on välillä 0,5-1,5 miljoonaa solua per kaivo. Tässä työssä testattiin solumääriä 0,5, 0,75 ja 0,8 miljoonaa solua/kaivo. Solujen lukumäärä lasketaan yhteen kahdelta laskualueelta. Kun tästä tuloksesta otetaan keskiarvo ja kerrotaan 10 000:lla, saadaan solumäärä millilitraa suspensiota kohden (c_s). Laimennokseen tarvittava solususpension määrä lasketaan kaavalla (1):

$$V_s = \frac{c_l \cdot V_l}{c_s} \quad (1)$$

missä V_s = solususpension määrä (ml)

c_l = laimennoksen pitoisuus (milj./ml)

V_l = laimennoksen tilavuus (ml)

c_s = solususpension pitoisuus (milj./ml)

Laskujen perusteella valmistettiin tarvittavat laimennokset kullekin solumäärälle. Laimennokset valmistettiin falcon-putkiin, joihin pipetoitiin tarvittava määrä mTeSRTM1-mediumia ja ROCK-inhibiittoria sekä solususpensiota. Laimennoksia pipetoitiin koutatulle 12-kuoppalevyille 1 ml/kaivo. Päivinä -3, -2 ja -1 vaihdettiin soluille 2 ml mTeSRTM1-mediumia per kaivo.

Varsinainen erilaistus aloitettiin päivänä 0 lisäämällä soluille insuliinitonta RPMI/B27-mediumia, johon oli lisätty pitoisuuden 12 μ M mukainen määrä CHIR99021-reagenssia. Mediumia lisätään soluille 2 ml/kaivo, joten 12-kuoppalevyille tarvitaan mediumia 24 ml. Tähän määrään mediumia lisätään 8 μ l 36 mM CHIR99021-reagenssia, jolloin saadaan 12 μ M-liuos. Mediumin lisäyksen kellonaika on merkittävä muistiin, sillä CHIR99021-reagenssi on poistettava tasan 24 tunnin kuluttua, jolloin tilalle laitetaan insuliinitonta RPMI/B27-mediumia 2 ml/kaivo.

Päivänä 3 lisättiin soluille IWP4-reagenssi. Valmistettiin yhdistetty medium keräämällä vanhaa mediumia 1 ml/kaivo, eli yhteensä 12 ml, ja yhdistämällä se 12 ml:aan uutta insuliinitonta RPMI/B27-mediumia. IWP4-reagenssin stokkiliuoksen pitoisuus on 36 mM, ja sitä lisätään 2 μ l kahta millilitraa mediumia kohden. 24 ml:aan yhdistettyä mediumia tarvitaan siis 24 μ l IWP4-reagenssia. IWP4-pitoisuus on tällöin 5 μ M. Kaivoihin jäänyt vanha medium kerättiin pois ja tilalle lisättiin yhdistettyä mediumia 2 ml/kaivo. Päivänä 5 yhdistetty medium kerättiin pois ja tilalle laitettiin insuliinitonta RPMI/B27-mediumia 2 ml/kaivo. Päivänä 7, ja sen jälkeen joka kolmas päivä, soluille vaihdettiin insuliinia sisältävä RPMI/B27-medium. Ensimmäiset sykkivät solukoloniat voidaan havaita päivien 8 ja 10 välillä. Päivänä 12 sykkinnän pitäisi olla jo runsasta.

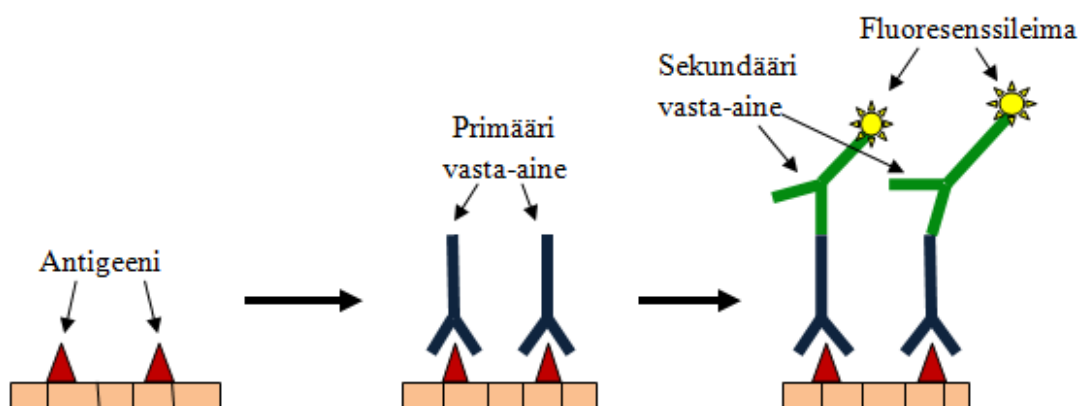
4.6 Erilaistuneiden solujen tarkastelu mikroskoopilla

Soluja tarkasteltiin päivittäin valomikroskoopilla. Niiden kasvua, morfologiaa ja kolonioiden laatua tarkasteltiin ja muutoksia dokumentoitiin ottamalla kuvia. Suurennoksena käytettiin 4x objektiiviä. Mikroskoopissa oli lämmitettävä näytepöytä, jolla solut saatiin pysymään lämpiminä ja sykkivinä. Soluja ei kuitenkaan ole suositeltavaa pitää inkubaattorin ulkopuolella yli 30 minuuttia (Venäläinen, henkilökohtainen tiedonanto 02.12.2013).

Erilaistuvien solujen morfologian muutoksia seurattiin päivittäin, mutta tarkemmat kuvaukset kustakin kaivosta tehtiin suurin piirtein päivänä 17 ja päivänä 30. Päivänä 17 kaikki erilaistuvat solut ovat jo varmasti erilaistuneet, ja päivänä 30 seurattiin erilaistuneiden solujen morfologiaa ja käyttäytymistä pidemmässä feeder-free-viljelyssä.

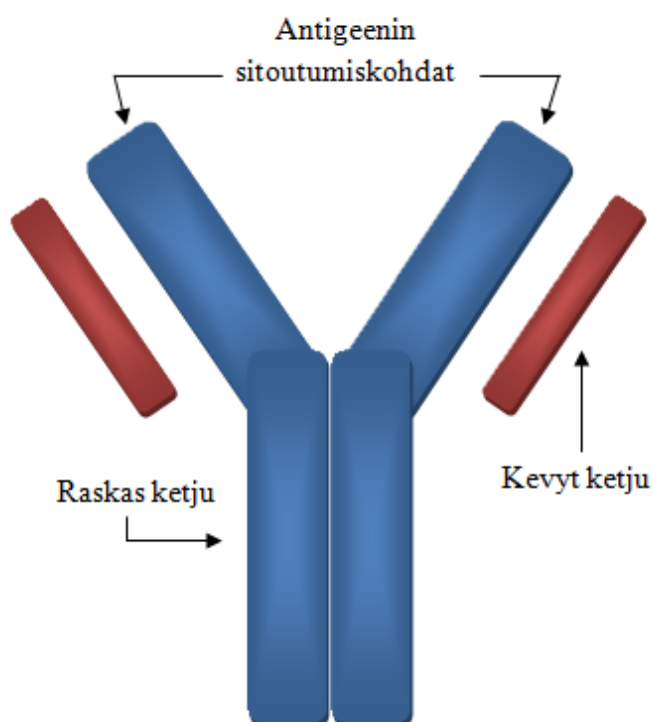
4.7 Immunosytokemialliset värjäykset

Immunosytokemiallisissa värjäyksissä käytetään vasta-aineita, eli antibodeja, jotka tunnistavat tietyn antigeenin (Lydyard, Whelan & Fanger 2004). Antigeeninä toimii jokin solun proteiini, ja värjäyksillä pystytään selvittämään sen määrää ja sijaintia solussa. Primäärivasta-aine tunnistaa antigeenin ja sitoutuu siihen (Lydyard, Whelan & Fanger 2004). Tunnistus perustuu siihen, että antigeenin jokin tietty rakenneosaa sopii vasta-aineen vastaavaan rakenneosaan (Goldsby, Kindt, Osborne & Kubly 2003). Suorassa immunosytokemiallisessa värjäyksessä primäärivasta-aine on leimattu jollakin merkkiaineella, kuten fluoresenssi leimalla tai entsyymileimalla, joka voidaan havaita. Epäsuorassa menetelmässä primäärivasta-aine ei ole leimattu. Tällöin käytetään leimattua sekundäärivasta-ainetta, joka tunnistaa primäärivasta-aineen ja sitoutuu siihen. Primäärivasta-aine toimii siis sekundäärivasta-aineen antigeeninä. (Lydyard, Whelan & Fanger 2004.) Kuvassa 1 on havainnollistettu epäsuoraa värjäysmenetelmää.



KUVA 1. Epäsuora immunosytokemiallinen värjäys. Primäärivasta-aine sitoutuu solukalvolla olevaan antigeeniin. Leimattu sekundäärivasta-aine puolestaan sitoutuu primäärivasta-aineeseen. Leima on sekundäärivasta-aineen runko-osassa, jotta se ei häiritse vasta-aineen aktiivisuutta. Piirretty mukailen Lylyard, Whelan & Fanger 2004.

Vasta-aineet ovat rakenteeltaan Y-kirjaimen muotoisia glykoproteiineja (Lydyard, Whelan & Fanger 2004). Ne koostuvat kahdesta identtisestä raskasketjusta ja kahdesta identtisestä kevytaketjusta (kuva 2). Raskasketjut muodostavat Y-kirjaimen varren ja yläosan haarojen sisäpinnat. Kevytketjut puolestaan muodostavat yläosan haarojen ulkopinnat. (Campbell & Farrell 2012.) Ketjut ovat sitoutuneet toisiinsa rikkisilloilla ja ei-kovalenttisilla sidoksilla (Goldsby, Kindt, Osborne & Kuby 2003). Antigeenin sitoutumiskohta on Y-kirjaimen yläosan haarojen päissä (Campbell & Farrell 2012).



KUVA 2. Vasta-aineen rakenne. Piirretty mukaillen Goldsby, Kindt, Osborne & Kuby 2003.

Tässä työssä antigeeninä toimi sydänsolujen troponiini T-proteiini. Primäärivasta-aineena käytettiin vuohen troponiini T-vasta-ainetta. Sekundäärivasta-aineena oli aasin anti-vuohi-vasta-aine, ja leimana oli fluoresenssileima. Värjäysmenetelmä oli siis epäsuora. Lisäksi solujen tumat värjättiin DAPI-värillä. Värjäysprotokolla on esitelty liitteessä 1. Värjättäviksi kaivoiksi valittiin jokaisesta linjasta mahdollisimman erilaisia kaivoja. Valittiin valomikroskoopilla tarkasteltuna parhaiten sykkiviä kaivoja, mutta myös sykkimättömiä kaivoja, jotta nähdään sisältävätkö ne kuitenkin troponiiniposiitivisia soluja.

Troponiini on kolmesta alayksiköstä muodostuva proteiinikompleksi, joka esiintyy sydän- ja luurankolihaksissa (Farah & Reinach 1995). Troponiini säätelee lihaksen supistumista solunsisäisen kalsium-ionipitoisuuden muutoksien perusteella (Sydänryhmän tietokanta 2013). Troponiinin kolme alayksikköä ovat troponiini T, troponiini I ja troponiini C. Alayksiköillä on omat tehtävänsä troponiinikompleksissa: troponiini T sitoo kompleksin tropomyosiinisäikeeseen, troponiini I inhiboi aktomyosiinin ATPaasia ja troponiini C sitoo neljä kalsium-iona säädellen siten säikeen supistumista (Farah & Reinach 1995.) Aikuisen sydänlihaksen troponiini T:n molekyylissä aminohappokoostumus on erilainen verrattuna luustolihaksen troponiineihin, joten on mahdollista määrittää sydänspesifisiä troponiini T-proteiineja (Katus ym. 1991).

4.8 Cytospin

Cytospin-menetelmässä laimennettuja soluliukuksia sentrifugoidaan menetelmään tarkoitettulla laitteella. Laitteessa on 12 kappaletta näytekolonneja, joista solut sentrifugoitaessa lennähtävät kolonnin telineeseen kiinnitetyille objektilasille. Telineeseen asetettiin ensimmäisenä objektilasi. Objektilasin päälle laitettiin halkaisijaltaan 15 mm oleva peitinlasi. Peitinlasin päälle asetettiin imupaperi sekä näytekolonne, ja teline suljettiin, jolloin osat pysyivät paikallaan. Sentrifugoinnin aikana solut siirtyvät näytekolonnista imupaperissa olevan reiän läpi peitinlasille.

Solulinjoista UTA.02912.HCMTs, UTA.00102.LQT1 ja UTA.04602.WT tehtiin kustakin yksi näyte. Yhteen näytteeseen otettiin mukaan kolme solulinjan kaivoa. Kaivot yritettiin valita siten, että ne edustaisivat mahdollisimman hyvin kaikkia 12-kuoppalevyllä olevia kaivoja. Kunkin solulinjan näytteestä tehtiin kaksi rinnakkaista näytettä. UTA.05503.CPVT-linjasta tehtiin kaksi näytettä. Toiseen näytteeseen valittiin kolme parasta kaivoa. Näissä kaivoissa oli koko kaivoon ulottuva sykkivä solumatto. Toisen näytteen kolme kaivoa valittiin kuten muidenkin linjojen näytteisiin, eli siten että ne edustaisivat mahdollisimman hyvin koko 12-kuoppalevyä. CPVT-linjan kummastakin näytteestä tehtiin kaksi rinnakkaista näytettä.

Solujen valmistelu aloitettiin irrottamalla solut kaivojen pohjista trypsiinillä. Jokaiseen kaivoon pipetoitiin 0,5 ml trypsiiniä ja soluja inkuboitiin +37 asteessa kunnes solut

pystyttiin purskuttelemaan yksisolususpensioksi. Kun soluaggregaatit oli hajotettu, lisättiin kaivoihin 0,5 ml mediumia ja kerättiin jokaisen näytteen kaivot omiin falcon-putkiinsa. Kaivot pestiin vielä 1 millilitralla mediumia, jotta saatiin kaikki solut falcon-putkiin. Jokaisessa putkessa oli tässä vaiheessa 4 ml solususpensiota.

Yhteen rinnakkaiseen näytteeseen tuli soluja 50 000. Tilavuus yhdelle rinnakkaiselle näytteelle on 150 µl. Jokaisesta näytteestä tehtiin kaksi rinnakkaista, joten tarvittava solumäärä oli 100 000 solua/näyte ja tilavuus 300 µl. Näytteiden solumäärät laskettiin ja tulosten perusteella selvitettiin, kuinka paljon kutakin näytettä tarvitaan, jotta solumäärä olisi 100 000.

Tarvittava määrä kutakin näytettä pipetoitiin 15 ml:n falcon-putkiin ja sentrifugoitiin normaalilla sentrifuugilla 5 minuutin ajan nopeudella 300 rpm. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti imettiin pois ja putken pohjalle jäänyt solupelletti resuspensoitiin 300 µl:aan PBS:ää. Näistä näytteistä pipetoitiin Cytospin-laitteen näytekolonneihin 150 µl solususpensiota. Tämän jälkeen soluja sentrifugoitiin Cytospin-laitteella 5 minuutin ajan nopeudella 600 rpm. Sentrifugoinnin jälkeen peitinlasit irrotettiin varovaisesti telineistä ja asetettiin 12-kuoppalevyn kaivoihin. Solut fiksattiin 4 % PFA:lla.

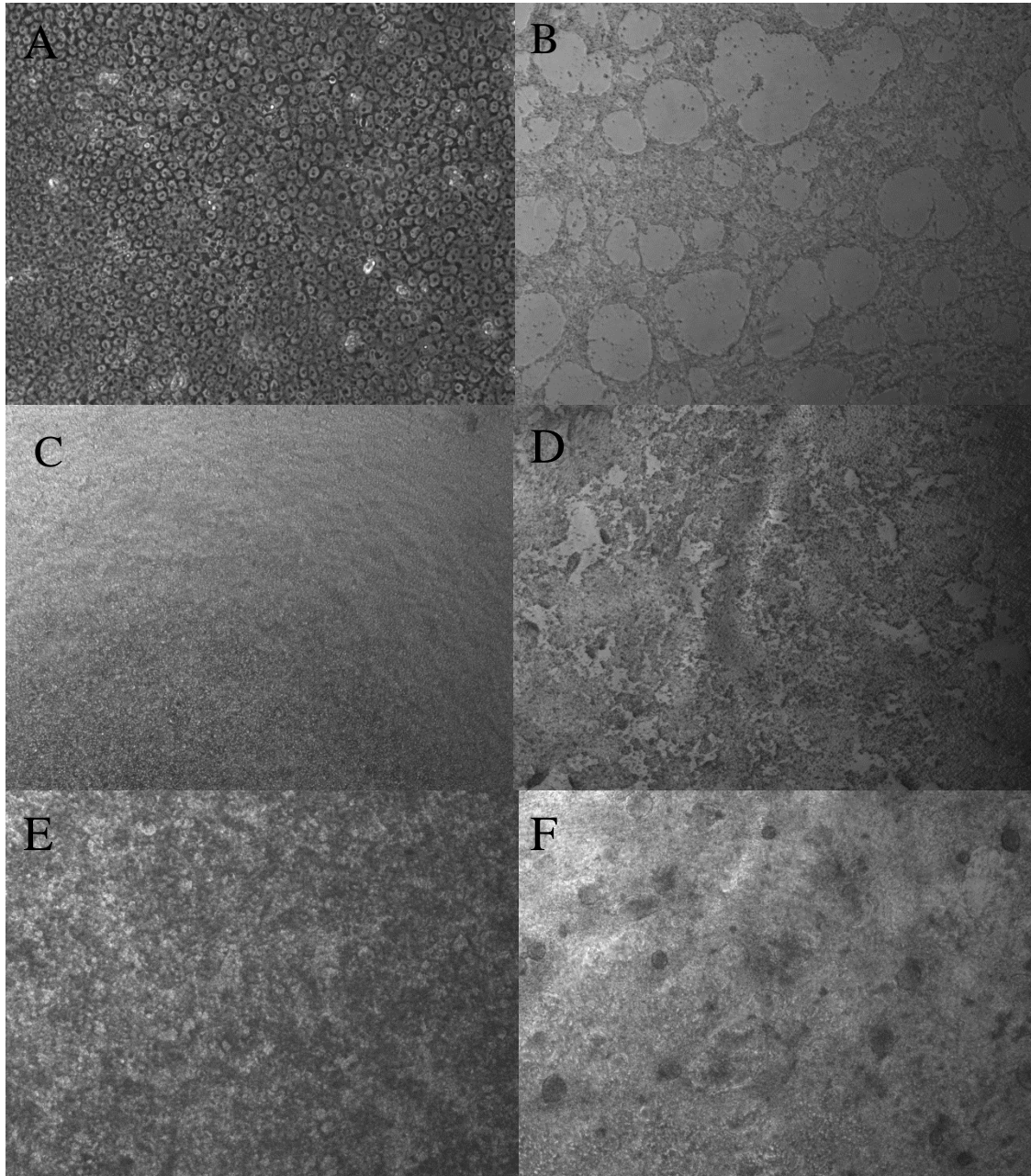
Soluista värjättiin troponiini T-rakenteet kappaleessa 4.7 (sivu 30) esitellyllä immunovärjäyksellä. Värjäyksen jälkeen kaivot kuvattiin. Kuvia saatiin noin 60 kappaletta jokaisesta kaivosta. Kuvista laskettiin troponiiniposiitiviset solut sekä kokonaissolumäärä. Solumäärien perusteella laskettiin, kuinka suuri prosentti kussakin kaivossa on troponiiniposiitivisia soluja.

5 TULOKSET

5.1 Sykkivien soluaggregaattien mikroskointi

Erilaistetuista kaivoista mikroskojettiin valomikroskoopilla sykkiviä solukolonioita. Tavoitteena olisi saada aikaiseksi yhtenä kokonaisuutena sykkivää monolayer-solumattoa. Tässä kappaleessa kuvaillaan kaivoista tehtyjä havaintoja ja käytetään matto-termin lisäksi termejä 3D-kolonia, sykkivä alue ja verkko. 3D-kolonia tarkoittaa soluaggregaattia, joka selkeästi nousee irti solumaton pinnasta. Sykkivällä alueella tarkoitetaan kohtaa, jossa yksi sykintäkeskus liikuttaa ympärillä olevaa solumattoa. Sykintä suuntautuu kohti sykintäkeskusta. Verkolla tarkoitetaan muodostelmaa, jossa useita sykkiviä alueita on kiinni toisissaan sykkivillä rihmoilla tai kannaksilla. Näiden sykkivien alueiden välillä olevien rihmojen paksuus vaihtelee. Paksurihmaisen verkon ja reikäisen maton välillä ei ole paljoa eroa, mutta niiden erottaminen toisistaan ei ollut työn tuloksien kannalta oleellista.

Erilaistettavista soluista tehtyjä havaintoja dokumentoitiin ottamalla kuvia. Kuvassa 4 on esitetty erilaistumisen aikana tapahtuvia muutoksia. Ennen erilaistamista kantasolut ovat pyöreitä ja koloniat tiiviitä (kuva 3.A) Erilaistuksen aloituksen jälkeen kantasolut muodostivat kaivon pohjaan verkon (kuva 3.B). Päivään 0 mennessä kantasolut olivat ehtineet täyttää kaivon, eli kaivot olivat konfluentteja (kuva 3.C). CHIR99021-käsittelyn aikana soluja kuoli jonkin verran, ja kaivoihin ilmaantui tyhjiä kohtia (kuva 3.D). IWP4-käsittelyn jälkeen, päivänä 4, solumatto alkoi näyttää erilaistuneemmalta (kuva 3.E). Solumatto näytti tummemmalta, ja sen pinta oli epätasaisempi kuin päivänä 0 otetussa kuvassa. Kun erilaistettuja soluja ylläpidettiin, sydänsolut alkoivat yleensä kerääntyä tiiviimmin kolonioiksi. Kuvassa 3.F. on sykkivää solumattoa, johon on muodostunut tummempia, pyöreitä, sykkiviä kolonioita.



KUVA 3. Havaintoja erilaistumisesta. A) Erilaistumattomia kantasoluja B) päivä -3. C) päivä 0. D) päivä 1. E) päivä 4. F) päivä 14.

Linjan UTA.04602.WT ensimmäisessä erilaistuksessa havaittiin sykkiviä 5 kaivossa 18 kaivosta. Erilaistuminen ei siis ollut kovin vahvaa. Sykkivissä kaivoissa oli muutamia 3D-kolonioita, jotka nousivat ylöspäin solumatosta. Verkkoja tai mattomuodostelmia ei havaittu. Toinen erilaistuskerta oli parempi, ja sykkintää havaittiin kaikissa 12 kaivossa. 8 kaivoista oli kuitenkin erilaistunut heikosti, ja ne sisälsivät vain muutamia pieniä 3D-kolonioita. Neljässä hieman paremmin erilaistuneessa kaivossa havaittiin 3D-kolonioiden lisäksi muutamia pieniä sykkiviä alueita, joissa solumatto sykkii yhden sykkintäkeskuksen ympärillä. Kolmannella erilaistuskerralla sykkiviä soluja oli 11

kaivossa 12:sta. Sykkivissä kaivoissa oli lähinnä pieniä sykkiviä kolonioita ja muutamia 3D-kolonioita.

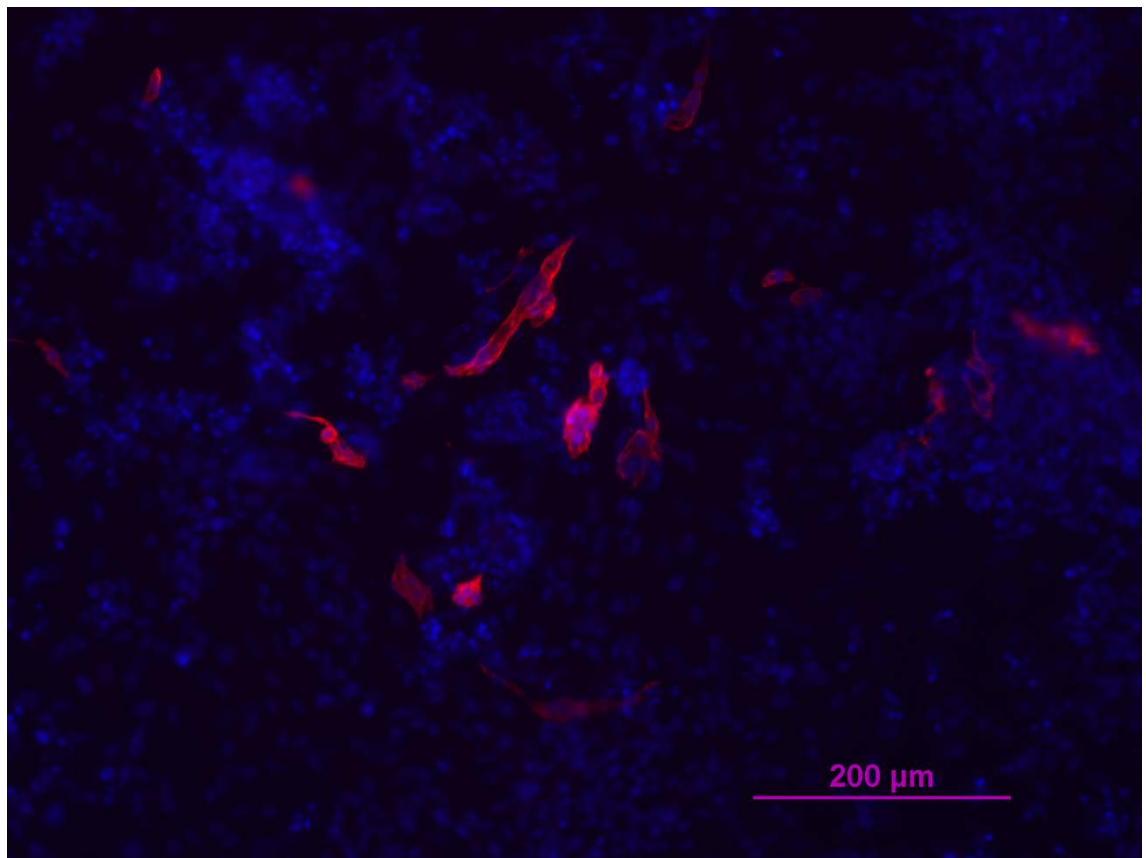
UTA.05503.CPVT-linjan ensimmäisessä erilaistuksessa kaikissa 18 kaivossa havaittiin sykkimistä. Kuusi kaivoista oli erilaistunut heikosti ja sisälsivät 3D-koloniota ja pieniä verkkoja. Muissa kaivoissa 3D-kolonioita ja verkkoja oli enemmän, ja muutamissa kaivoissa nähtiin jopa pieniä sykkiviä mattoja. Myös toisessa erilaistuksessa kaikki kaivot (8 kpl) sisälsivät sykkiviä soluja. Kahdessa kaivossa oli paljon sykkivää mattoa ja verkkoa. Muissa kaivoissa oli runsaasti erikokoisia 3D-kolonioita ja muutamia verkkoja. Kolmannessa erilaistuksessa useassa kaivossa havaittiin kaivon reunoja kiertävä sykkivä nauha. Lisäksi kaivoissa oli runsaasti sykkiviä alueita, joissa oli erillisiä sykintäkeskuksia sekä 3D-kolonioita. Myös kolmannessa erilaistuksessa kaikissa kaivoissa (11 kpl) oli sykkiviä soluja.

Linjan UTA.02912.HCMTs ensimmäisessä erilaistuksessa kaikki 18 kaivoa sykkivät. Yksi kaivo oli erilaistunut heikommin kuin muut. Muuten erilaistuminen oli kaivoissa hyvin tasaista, ja kaivot sisälsivät 3D-kolonioita ja erikokoisia verkkoja. Toisessa erilaistuksessa 17/18 kaivoa sykki. Näistä neljä merkattiin heikoiksi kaivoiksi, ja ne sisälsivät lähinnä vain muutamia 3D-kolonioita. Paremmen erilaistuneissa kaivoissa oli 3D-kolonioiden lisäksi runsaasti erikokoisia verkkoja. Kolmannella erilaistuskerralla 10/11 kaivoa sykki. Kaivoista kuitenkin 6 oli erilaistunut heikosti, ja niissä oli vain muutamia sykkiviä kohtia. Yksi kaivoista erottui selkeästi muista, koska siinä oli koko kaivon peittävä paksu sykkivä solumatto.

Linjan UTA.00102.LQT1 ensimmäisessä erilaistuksessa kaikki 12 kaivoa sykkivät, ja niissä oli koko kaivon peittäviä sykkiviä mattoja ja verkkoja. Sykintä oli todella voimakasta, ja osassa kaivoista, varsinkin verkkoja sisältävissä, soluverkot ja –matot olivat kiinni vain reunoilta ja verkko/matto velloi mediumissa sykinnän tahtiin. Kun soluja viljeltiin pidempään, suurimassa osassa kaivoista soluverkot olivat irronneet toiselta reunalta ja rullautuneet kasaan. Näiden rullautuneiden solukasojen havaittiin kuitenkin edelleen sykkivän. Toisella erilaistuskerralla kaikissa 9 kaivossa havaittiin sykkimistä, mutta viisi kaivoista oli erilaistunut heikosti. Heikot kaivot sisälsivät vain muutamia 3D-kolonioita. Paremmen erilaistuneissa kaivoissa oli muutamia pieniä verkkoja ja mattoja. Kolmannella erilaistuskerralla erilaistus ei onnistunut lainkaan, ja yhdessäkään kaivossa ei havaittu sykkiviä.

5.2 Immunovärjykset

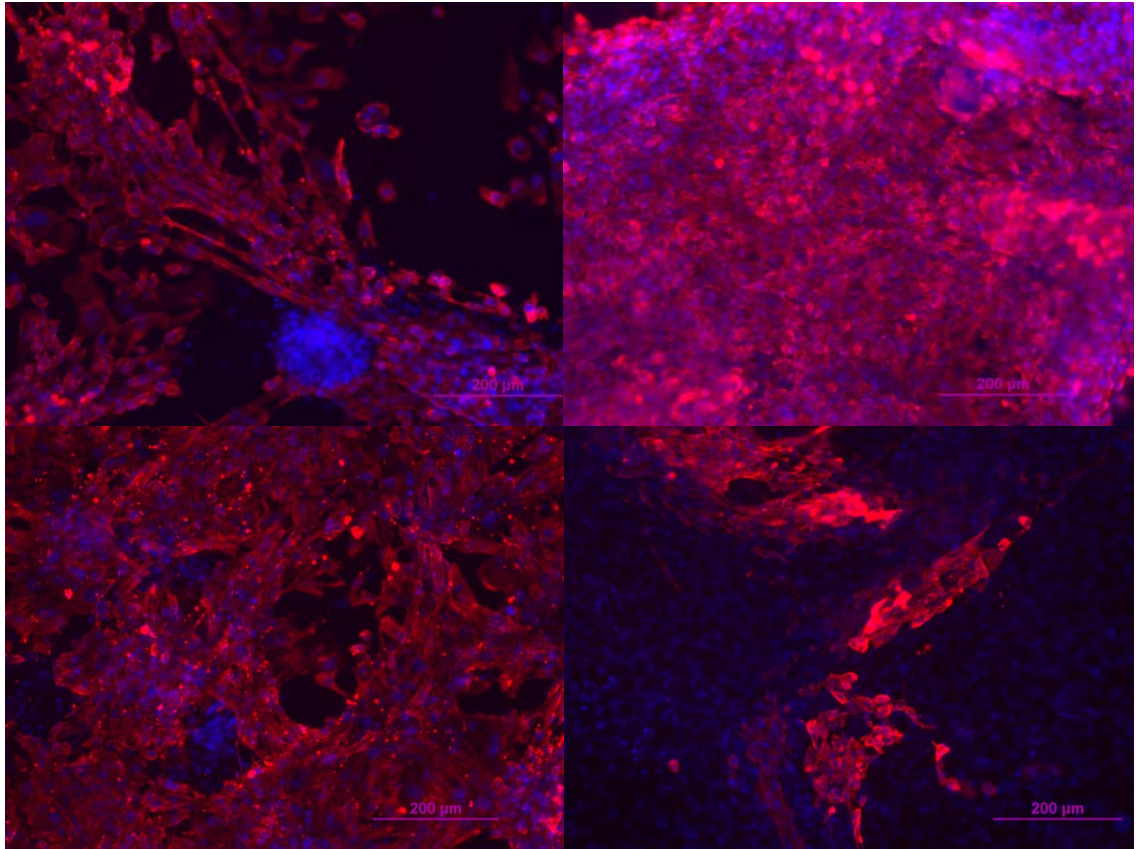
Linjan UTA.04602.WT immunovärjättyissä kaivoissa havaittiin vain muutamia positiivisia soluja (kuva 4). Positiivisia soluja oli harvakseltaan siellä täällä, ja suurimmaksi osaksi kaivot olivat negatiivisia. Yhdestä mikroskoopilla negatiiviseksi luokitellusta kaivosta löytyi myös muutama troponiiniposiitivinen solu. Erilaistuminen oli kaiken kaikkiaan heikkoa.



KUVA 4. Immunovärjäys UTA.04602.WT. Punaiset solut ovat troponiiniposiitivisia soluja. Siniset ovat solujen tumia.

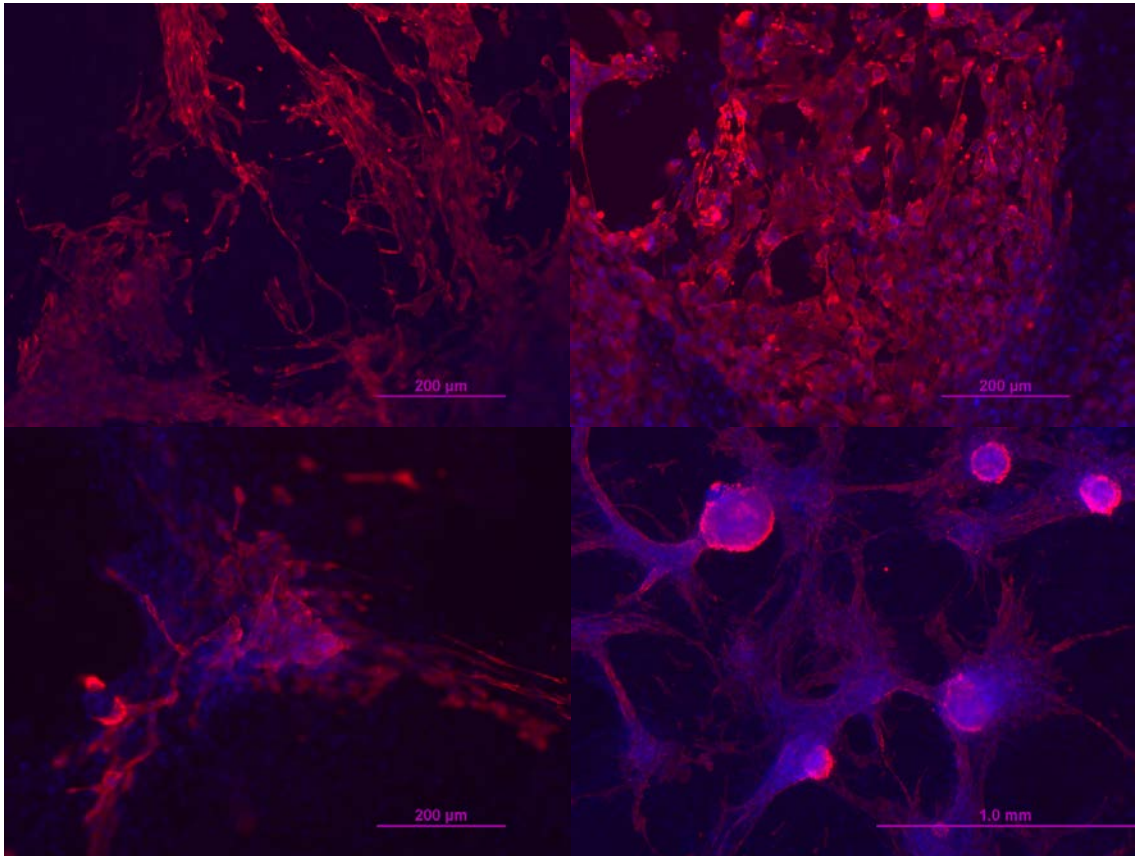
UTA.05503.CPVT-linjan ensimmäisen erilaistuskerran immunovärjättyissä kaivoissa havaittiin runsaasti troponiiniposiitivisia soluja. Kaivoissa oli paljon 3D-kolonioita ja yksittäisiä soluja ryppäissä sekä yksikseen. Lisäksi useassa kaivossa oli verkko- tai mattomuodostelmaa. Mattomuodostelmissa soluja oli useammassa kerroksessa. Toisen erilaistuskerran immunovärjättyissä kaivoissa oli verkkomuodostelmia sekä mattoja. Verkot ja matot olivat useampikerroksisia. Lisäksi kaivoissa havaittiin 3D-kolonioita ja

muutamia yksittäisiä troponiiniposiitiivisia soluja. Kuvaan 5 on koottu kuvia kummaltakin erilaistuskerralta.



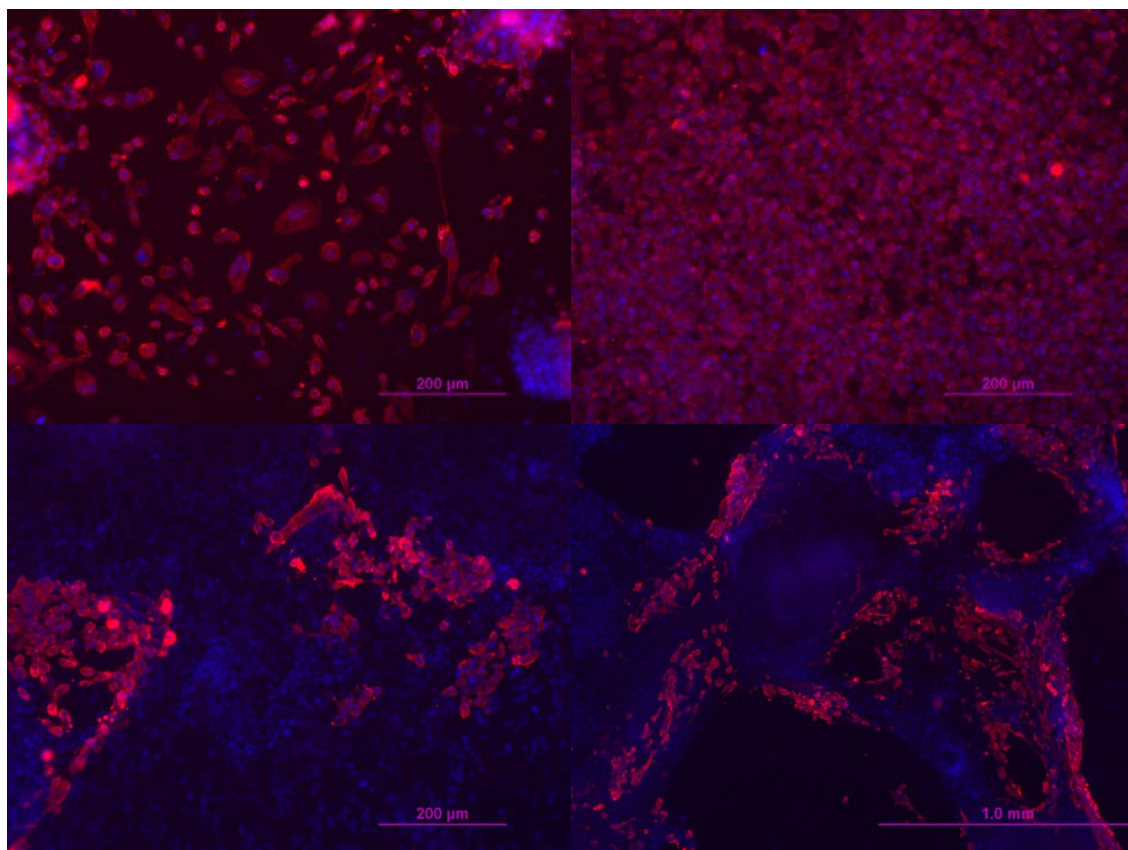
KUVA 5. Linjan UTA.05503.CPVT immunovärjäykset. Ylärivissä ensimmäisen erilaistuskerran kuvia. Oikealla verkon säikeitä ja vasemmalla kuva matosta. Alarivissä toisen erilaistuskerran kuvia. Oikealla kuva reikäisestä matosta ja vasemmalla soluryppäitä.

Linjan UTA.02912.HCMTs immunovärjättyissä kaivoissa havaittiin useita verkkoja. Osa verkoista oli pieniä ja osa lähes koko kaivon kokoisia. Kaikki verkot olivat useampikerroksisia. Lisäksi kaivoissa havaittiin yksittäisiä soluja ryppäissä sekä pieniä 3D-kolonioita. Kolme kaivoista oli mikroskoopilla tarkasteltaessa luokiteltu negatiivisiksi tai heikoiksi kaivoiksi. Immunovärjäyksistä kaivojen kuitenkin havaittiin sisältävän runsaasti troponiiniposiitiivisia soluja ja jopa verkkoja. Kuvaan 6 on koottu kuvia erilaistuksesta. UTA.02912.HCMTs-linjasta tehtiin immunovärjäykset vain yhdestä erilaistuskerrasta, koska toisella yrityksellä solut irtosivat pohjasta ja kuolivat ennen erilaistuksen aloitusta.



KUVA 6. Linjan UTA.02912.HCMTs immunovärjäyksen kuvia. Ylhäällä vasemmalla kuva verkon säikeistä. Ylhäällä oikealla kuva verkosta. Alhaalla vasemmalla solurypäs ja alhaalla oikealla verkkoa, jossa 3D-kolonioita. Viimeinen kuva otettu 4x suurennoksella, muut 10x suurennoksella.

UTA.00102.LQT1-linjan ensimmäisen erilaistuksen värjätyissä kaivoissa havaittiin paljon paksuja mattoja ja verkkoja. Kaikissa värjätyissä kaivoissa oli mattoa ja/tai verkkoa, ja niiden väleissä yksittäisiä positiivisia soluja sekä soluryppäitä. Matot ja verkot olivat useampikerroksisia, ja paikoitellen niissä oli mukana 3D-kolonioita. Toisen erilaistuskerran värjätyissä kaivoissa oli paljon positiivisia soluja ympäri kaivoja ja muutama pieni verkko, mutta ei mattoja. Positiiviset solut olivat ryppäissä tai nauhoissa sekä pieninä solulaattoina. Lisäksi kaivoissa oli yksittäisiä soluja sekä 3D-kolonioita. Kuvaan 7 on koottu kuvia erilaistuksista.



KUVA 7. UTA.00102.LQT1 immunovärjäyskuvat. Ylärivissä ensimmäisen erilaistuskerran kuvia. Oikealla kuvassa runsaasti yksittäisiä troponiiniposiitivisia soluja ja vasemmalla kuva matosta. Alhaalla toisen erilaistuskerran kuvia. Oikealla soluryppäitä ja vasemmalla verkkoa, jossa harvakseltaan positiivisia soluja. Viimeisen kuvan suurennos on 4-kertainen, muiden 10-kertaisia.

5.3 Cytospin

Cytospin-määrittelyn tehtiin kunkin linjan kolmannelta erilaistuskerrasta. UTA.05503.CPVT, UTA.02912.HCMTs ja UTA.04602.WT erilaistuivat kuten edellisilläkin kerroilla. UTA.00102.LQT1-linja ei sen sijaan erilaistunut kolmannella yrityksellä lainkaan. Solut kuitenkin käsiteltiin Cytospin-menetelmällä ja värjättiin, mutta värjäyksissä ei havaittu lainkaan troponiiniposiitivisia soluja. Tästä syystä UTA.00102.LQT1-linjalle ei pystytty laskemaan erilaistumistehokkuutta. Erilaistumistehokkuutta ei laskettu nolaksi, koska aikaisemmilla erilaistuserroilla LQT1-linja erilaistui hyvin.

Värjätyistä Cytospin-kaivoista otettiin kuvat ja solumäärät laskettiin kullekin rinnakkaiselle näytteelle erikseen. Taulukossa 1 on esitelty kunkin rinnakkaisen

näytteen troponiiniposiitivisten solujen määrä, kokonaissolumäärä ja näiden perusteella laskettu erilaistumisprosentti.

TAULUKKO 1. Cytospin-tulokset.

Näyte	Positiivisia soluja	Soluja kaikkiaan	Erilaistumis%
BEST (CPVT) 1	3990	12466	32
BEST (CPVT) 2	2387	8121	29,4
CPVT 1	874	5682	15,4
CPVT 2	1147	8878	12,9
HCMTs 1	452	5899	7,7
HCMTs 2	832	9261	9
WT 1	187	5061	3,7
WT 2	308	7881	3,9
LQT 1 ja 2	0	ei laskettu	ei laskettu

UTA.05503.CPVT-linjan parhaiden kaivojen erilaistumistehokkuuksien keskiarvo oli 30,7 %. Saman linja keskivertokaivojen erilaistumistehokkuuksien keskiarvo oli 14,2 %. UTA.02912-HCMTs-linjan erilaistumistehokkuuksien keskiarvo oli 8,4 % ja linjan UTA.04602.WT keskiarvo oli 3,8 %. Linjan UTA.00102.LQT1 erilaistumistehokkuuksia ei saatu laskettua, koska linja ei 3. erilaistuskerralla erilaistunut lainkaan.

6 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää mahdollisia solulinjakohtaisia eroja sydänerilaistustehokkuudessa käytettäessä pienmolekyylierilaistusmenetelmää. Pienmolekyylierilaistusmenetelmän käyttöönottoa sydänsolujen erilaistamiseen suunnitellaan Sydänryhmässä ja tästä syystä selvitetään, miten eri solulinjat käyttäytyvät kyseisellä menetelmällä erilaistettaessa ja tutkitaan solulinjojen välisiä eroja erilaistustehokkuudessa. Ideaalitilanteessa kaivoihin olisi saatu muodostumaan sykkivää monolayer-mattoja. Erilaistunut monolayer-solukerros olisi tutkimuksen kannalta optimaalinen (Rajala ym. 2011), sillä yksisoluisenkerroksen erilaistaminen on helpommin kontrolloitavissa ja toistettavissa (Mummary ym. 2012).

Kaikki työssä käytetyt solulinjat saatiin erilaistettua pienmolekyylierilaistusmenetelmällä. Erilaistumista osoittaa soluviljelmissä havaittu solukolonioiden spontaani sykintä (Kujala ym. 2012). Lisäksi soluista pystyttiin värjäämään sydänlihassoluille spesifisiä troponiini T-proteiineja (Katus ym. 1991).

UTA.05503.CPVT-solulinja erilaistui solulinjoista parhaiten. Se erilaistui jokaisella erilaistuskerralla suhteellisen hyvin. Kaivoissa oli myös sykkivää solumattoja, mutta se oli yleensä paksumpaa, ei monolayer-mattoja. Erilaistustehokkuus keskivertokaivoissa oli 14,2 %. Parhaiden kaivojen erilaistustehokkuus oli 30,7 %. Keskiverto kaivojen ja parhaiden kaivojen erilaistustehokkuuksien välinen ero on yli 15 prosenttiyksikköä, mikä on paljon.

Parhaissa CPVT-solulinjan kaivoissa oli mikroskopioitaessa nähty koko kaivoon ulottuva sykkivä solumatto ja arveltu sykkivien solujen osuuden olevan n. 90 %. Cytospin-tulos jäi kuitenkin vain 30,7 %:iin, joten ilmeisesti sykkivässä solumatossa vain osa soluista on oikeasti sykkiviä ja liikuttavat ympärillään olevia soluja sykinnän tahdissa. Myös artikkelin (Lian ym. 2013) mukaan menetelmällä olisi mahdollista päästä 82-98 % saantoon. Tulosten perusteella tässä työssä jäätin kuitenkin kauas Xiaojun Lian ym. (2013) artikkelin mukaisesta saantoprosentista. Parhailla kaivoilla saatu 30 %:n erilaistustehokkuus on kuitenkin parempi kuin END2- ja EB-menetelmissä. END2-menetelmän erilaistustehokkuus on parhaimmillaan noin 25 %, mutta yleensä kuitenkin vain 2-3 % (Mummary ym. 2012).

Toiseksi parhaiten erilaistui UTA.02912.HCMTs-solulinja. Se erilaistui myös jokaisella erilaistuskerralla, mutta kaivoissa oli huomattavasti enemmän heikosti erilaistuneita ja vähemmän matto-muodostelmia kuin CPVT-solulinjalla. UTA.02912.HCMTs-solulinjan erilaistumistehokkuus oli 8,4 %. Tämän linjan kohdalla havaittiin, muista solulinjoista poiketen, että erilaistuneiden solujen viljelyn edetessä verkkomuodostelmat kaivoissa yleistyivät. Tämä saattaisi viitata muita solulinjoja hitaampaan erilaistumiseen. Muilla linjoilla isojen 3D-kolonioiden määrä tuntui kasvavan pidemmässä viljelyssä, tarkoittaen että verkot ja sykkivät alueet ikään kuin kuroutuivat kasaan 3D-kolonioiksi.

Kontrollilinja UTA.04602.WT erilaistui heikoiten. Sen kuoppalevyillä oli paljon kokonaan sykkimättömiä ja erilaistumattomia kaivoja ja sykkivät koloniat olivat 3D-kolonioita. Mattoja ei ollut ollenkaan. UTA.04602.WT-solulinja oli tehty terveän henkilön soluista, joten erilaistuvat solut sisälsivät oikein toimivat sydänsolujen erilaistumiseen vaikuttavat geenit. Koska tämä kontrollilinja erilaistui heikoiten, voidaan todeta, että muissa linjoissa olevat geenivirheet eivät vaikuta sydänerilaistumiseen ainakaan negatiivisesti.

UTA.00102.LQT1-solulinja erilaistui hyvin epätasaisesti. Ensimmäinen erilaistus sen osalta oli todella hyvä, jopa koko työn paras. Kaikki kaivot sykkivät voimakkaasti, ja niissä oli paljon sykkivää mattoa ja verkkoa. Osa sykki jopa niin rajusti, että solumatto/verkko irtosi kaivon keskeltä ja oli kiinni vain reunoista keskiosan velloessa mediumissa sykinnän tahdissa. Toinen erilaistuskerta oli huomattavasti heikompi. Siinä oli vähemmän mattomuodostelmia ja enemmän 3D-kolonioita. Kolmannella kerralla LQT1-linja ei erilaistunut ollenkaan. Kolmas erilaistus tehtiin pakastuksen jälkeen, ja on mahdollista, että linjassa olisi tapahtunut mutaatio tai karyotyyppimuutos. Feeder-free-menetelmät ovat herkkiä solujen karyotyyppimuutoksille (Draper ym. 2004), ja pakastuksenkin tiedetään lisäävän niiden riskiä (Venäläinen, henkilökohtainen tiedonanto 16.09.2013) Erilaistumistehokkuutta ei UTA.00102.LQT1-solulinjalle saatu laskettua, koska kolmas erilaistuskerta ei onnistunut. Solulinjojen pakastuksen ei muilla linjoilla havaittu vaikuttavan erilaistumistehokkuuteen.

Käytetyn menetelmän toistettavuuden todettiin olevan heikko. Erilaistumisen tehokkuus vaihteli hyvin paljon linjojen sisällä erilaistuskertojen välillä. Välillä erilaistus onnistui

loistavasti ja välillä ei ollenkaan. Pienmolekyylierilaistusmenetelmä todettiin herkäksi pienillekin muutoksille ja menetelmän käyttäjästä johtuville eroille eri erilaistuskertojen välillä. Tämä tulos oli odotettavissa, koska feeder-free-menetelmät tiedetään herkäksi pienillekin muutoksille vaikuttavien reagenssien pitoisuuksissa, vaikutusajoissa ja reagenssien lisäysten ja poistojen ajankohdissa (Mummery ym. 2012).

Menetelmässä oli ongelmana myös solujen irtoaminen pohjasta kesken kaiken, ja tämä tapahtui myös työn aikana muutamaan kertaan. Solujen taipumus irrota kaivojen pohjista on todettu myös Xiaojun Lian ym. (2013) artikkelissa, johon menetelmä perustuu. Yhdellä erilaistuskerralla HCMTs- ja LQT1-solulinjan solut olivat irronneet kaivojen pohjista yön inkubaation aikana, eikä tähän keksitty mitään selkeää syytä. Lisäksi solujen kasvutahdin ennakointi oli hyvin haastavaa. Tavoitteena oli, että kasvatusvaiheessa solut olisi jaettu kerran viikossa. Jakopäivä vaihteli kuitenkin hyvin paljon, koska solut kasvoivat hyvin eri tahtia kunkin jaon jälkeen. Haasteita tämä aiheuttaa käytännön työhön, koska töiden suunnittelu on hankalaa solujen käyttäytymisen huonon ennustettavuuden vuoksi.

Aikaisemmissa tutkimuksissa on todettu erilaistumispotentiaalin vaihtelevan eri solulinjojen välillä (Xu 2012; Rajala ym. 2011). Myös tässä työssä havaittiin selkeitä eroja solulinjojen erilaistumistehokkuuksissa. Koska tietyt erilaistusolosuhteet saattavat toimia yhdellä solulinjalla, mutta eivät toisella linjalla, menetelmän solulinjakohtainen optimointi on tarpeen, mikäli jokaisella solulinjalla halutaan päästä parhaaseen erilaistumistehokkuuteen. Erot erilaistumispotentiaalissa saattavat johtua solun sisäisestä signaloinnista (Xu 2012). On esimerkiksi havaittu, että solut, joilla on vähän solunsisäisiä Wnt-signaalointireitin ligandeja erilaistuvat heikommin kuin solut, joilla solunsisäisiä Wnt-signaalointireitin ligandeja on runsaasti. Tämä korostaa pienmolekyylierilaistusmenetelmässäkin hyödynnetyn Wnt-signaalointireitin tärkeyttä erilaistumisessa. (Xu 2012.) iPS-solujen ollessa kyseessä, erilaistumistehokkuuteen saattaa vaikuttaa myös uudelleen ohjelmoinnissa käytetty virusvektori (Rajala ym. 2011). Tässä työssä käytetyt solulinjat olivat kaikki virusvektoreiden avulla tuotettuja iPS-solulinjoja.

Vaikka jokaisesta käytetystä solulinjasta saatiinkin erilaistettua sydänlihassoluja ja menetelmä havaittiin toimivaksi, on suositeltavaa optimoida pienmolekyylierilaistusmenetelmää ennen rutiininomaista käyttöä tutkimusryhmässä.

Optimointi voidaan tehdä joko jokaiselle solulinjalle erikseen, tai optimoida menetelmä yleisesti, siten että se toimii kaikilla solulinjoilla samanlaisena. Tällöin erilaistumistehokkuudet eivät ehkä ole parhaita mahdollisia, mutta tärkeintä olisi että menetelmän toistettavuus paranisi.

Sydänerilaistumistehokkuudessa havaittiin siis selkeitä eroja eri solulinjojen välillä. Lisäksi havaittiin solulinjan sisällä eri erilaistuskertojen välillä eroja ja samalla erilaistuskerralla rinnakkaisen kaivojen erilaistuvan välillä hyvin eritavoin. Solulinjojen välillä olevien sydänerilaistustehokkuuserojen tietäminen helpottaa tutkimusryhmän töiden suunnittelua ja käytettävän solulinjan valintaa. Tämän opinnäytetyön myötä havaittiin lisäksi, että mikäli solulinjoilla halutaan päästä parhaaseen erilaistumistehokkuuteen, menetelmä kannattaa optimoida kullekin solulinjalle erikseen. Menetelmän toistettavuus ja ennustettavuus todettiin heikoiksi, ja tästäkin syystä optimointi olisi suositeltavaa. Olisi myös mielenkiintoista selvittää, mikä vaikuttaa solulinjojen välisiin eroihin erilaistumistehokkuudessa ja miksi rinnakkaisetkin kaivot erilaistuvat välillä hyvin eri tavoin. Erilaistumistehokkuuteen solussa vaikuttavien mekanismien selvittäminen edistää tavoitetta tuottaa soluja terapeuttisiin sovelluksiin (Rajala ym. 2011). Lisäksi voisi testata, pysyvätkö solulinjojen väliset erot samanlaisina, mikäli työ toistetaan.

LÄHTEET

Amit, M., Gerecht-Nir, S. & Itskovitz-Eldor, J. 2005. Culture, Subcloning, Spontaneous and Controlled Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. Teoksessa Bongso, A. & Lee, Eng Hin. (ed.) Stem Cells From Bench to Bedside. Singapore: FuIsland Offset Printing (S) Pte Ltd.

BD Bioscience. 2012. Guidelines for use. Product: BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix, 5 mL Vial. <http://www.stemcell.so/images/upload/pdf/5153a954d388a.pdf>

BioMediTech. Regenerative Medicine. Luettu 12.05.2014.
http://www.biomeditech.fi/research/regenerative_medicine.php

Bjälle, J., Haug, E., Sand, O., Sjaastad, O. & Toverud, K. 1999. Ihminen. Fysiologia ja anatomia. Suom. Meditran Oy. Helsinki: WSOY.

Boheler, K., Czyz, J., Tweedie, D., Yang, H-T., Anisimov, S. & Wobus, A. 2002. Differentiation of Pluripotent Embryonic Stem Cells Into Cardiomyocytes. Circulation Research 2002; 91: 189-201.

Bongso, A. & Lee, Eng Hin. 2005. Stem Cells: Their Definition, Classification and Sources. Teoksessa Bongso, A. & Lee, Eng Hin. (ed.) Stem Cells From Bench to Bedside. Singapore: FuIsland Offset Printing (S) Pte Ltd.

Campbell, M. & Farrel, S. 2012. Biochemistry. 7th Edition. International Edition. Brooks/Cole Cengage Learning. China: China Translation & Printing Services Limited

Conner, A. 2001. Mouse Embryo Fibroblast (MEF) Feeder Cell Preparation. Tiivistelmä. Teoksessa Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, Inc.

Denning, C., Passier, R. & Mummery, C. 2005. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Cardiomyocytes. Teoksessa Bongso, A. & Lee, Eng Hin. (ed.) Stem Cells From Bench to Bedside. Singapore: FuIsland Offset Printing (S) Pte Ltd.

Draper, J., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H., Maltby, E., Johnson, J., Meisner, L., Zwaka, T., Thomson, J. & Andrews, P. 2004. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. Nature Biotechnology 22: 53-54.

Farah, C.S. & Reinach, F.C. 1995. The troponin complex and regulation of muscle contraction. The FASEB Journal 9:9:755-767.

Ferrara, N., Gerber, HP. & LeCounter, J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. Abstract. Nat Med. 9(6):669-76.

GeneCards®. The Human Gene Compendium. 2013 Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DKK1>

Goldsby, R., Kindt, T., Osborne, B. & Kuby, J. 2003. Immunology. Fifth Edition. New York: W.H. Freeman and Company.

Katus, H.A., Remppis, A., Neumann F.J., Scheffold, T., Diederich, K.W., Vinar, G., Noe, A., Matern, G. & Kuebler, W. 1991. Diagnostic efficiency of troponin T measurements in acute myocardial infarction. *Circulation* 1991;83:902-912.

Kettunen, R., Hassinen, I., Peuhkurinen, K. & Kupari M. 2008. Sydänlihaksen rakenne ja toiminnot, sydän pumppuna. Teoksessa Heikkilä, J & Kupari, M.(toim.) Kardiologia. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Kujala, K., Paavola, J., Lahti, A., Larsson, K., Pekkanen-Mattila, M., Viitasalo, M., Lahtinen, A., Toivonen, L., Kontula, K., Swan, H., Laine, M., Silvennoinen, O. & Aalto-Setälä, K. 2012. Cell Model of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia Reveals Early and Delayed Afterdepolarizations. *Plos ONE* 7:9:1-10.

Lahti, A., Kujala, V., Chapman, H., Koivisto, A-P., Pekkanen-Mattila, M., Kerkelä, E., Hyttinen, J., Kontula, K., Swan, H., Conklin, B., Yamanaka, S., Silvennoinen, O., & Aalto-Setälä, K. 2012. Model for long QT syndrome type 2 using human iPS cell demonstrates arrhythmogenic characteristics in cell culture. *Disease Models & Mechanisms* 5: 220-230

Lian, X., Zhang, J., Azarin, S., Zhu, K., Hazeltine, L. Bao, X., Hsiao, C. Kamp, T. & Palecek, S. 2013. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nature Protocols* 8:162-175.

Life TechnologiesTM. B-27®Supplement (50X) serum free. Luettu 16.04.2014. <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/17504044>

Life TechnologiesTM. StemPro®Accutase®Cell Dissociation Reagent. Luettu 16.4.2014. <http://www.lifetechnologies.com/fi/en/home/life-science/stem-cell-research/stem-cell-culture/stem-cell-research-misc/stempro-accutase.html>

Life TechnologiesTM. Versene Solution. Luettu 16.04.2014. <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/15040066>

Laki lääketieteellisestä tutkimuksesta 09.04.1999/488

Lehtinen, M. & Aalto-Setälä, K. 2012. Tamperelaista yhteistyötä Nobel-palkitun Professori Shinya Yamanakan kanssa. iPS-soluista tautimalleja perinnöllisille sydänsairauksille. *Analyysi* 1/2013, 6-10.

Li, Y., Powell, S., Brunette, E., Lebkowski, J. & Mandalam, R. 2005. Expansion of Human Embryonic Stem Cells in Defined Serum-Free Medium Devoid of Animal-Derived Products. Tiivistelmä. *Biotechnology and Bioengineering* 9:6:688-698.

Lylyard, P., Whelan, A. & Fanger, M.W. 2004. Immunology. Second Edition. © Garland Science/BIOS Scientific Publishers Limited. UK: Biddles Ltd.

Mummery, C. Ward-van Oostwaard, D., Doevendans, P., Spijker, R., van den Brink, S., Hassink, R., van der Hayden, M., Ophhof, T., Pera, M., de la Riviere, A., Passier, R. & Tertoolen, L. 2003. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Cardiomyocytes: Role of Coculture With Visceral Endoderm-Like Cells. *Circulation*. 2003;107:2733-2740.

Mummery, C., Zhang, J., Ng, E., Elliot, D., Elefanty, A. & Kamp, T. 2012. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells to Cardiomyocytes: A Methods Overview. *Circulation Research* 2012; 111: 344-358.

Nishikawa, S., Goldstein, R. & Nierras, C. 2008. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nature reviews. Molecular cell biology*. Volume 9: 725-729.

Noggle, S., Sato, N. & Brivanlou, A. 2005. Feeder-free Culture of Human Embryonic Stem Cells. Teoksessa Bongso, A. & Lee, Eng Hin. (ed.) *Stem Cells From Bench to Bedside*. Singapore: FuIsland Offset Printing (S) Pte Ltd.

Odorico, J., Kaufman, D. & Thomson, J. 2001. Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines. *Stem Cells* 19:13:193-204.

Ojala, M., Rajala, K., Pekkanen-Mattila, M., Miettinen, M., Huhtala, H. & Aalto-Setälä, K. 2012. Culture Conditions Affect Cardiac Differentiation Potential of Human Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE* 2012;7:10: 1-13.

Paananen, U., Pietiläinen, S., Raussi-Lehto, E., Väyrynen, P. & Äimälä, A-M. 2006. *Kätilötyö*. 1.painos. Tampere: Tammer-Paino Oy.

Rajala, K., Pekkanen-Mattila, M. & Aalto-Setälä, K. 2011. Cardiac Differentiation of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells International* 2011, Article ID 383709.

Skottman, H. & Hovatta, O. 2006. Culture conditions for human embryonic stem cells. *Reproduction* 132: 691-698.

STEMCELLTM Technologies. 2012. Maintenance of Human Pluripotent Stem Cells in mTeSRTM1 and TeSRTM2. Technical Manual. Version 3.0.0.

Suomen Sydänliitto ry. 2010. Pitkä QT- oireyhtymä. Verkkojulkaisu. Luettu 4.4.2014. <http://verkkojulkaisu.viivamedia.fi/sydanliitto/qt>

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. & Yamanaka, S. 2007. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* (2007),131(5):861-872

Takahashi, K. & Yamanaka, S. 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663-676.

Tocris Bioscience. Y-27632 dihydrochloride. Luettu 16.04.2014. http://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=1382#.U07qGPI_usw

Tutkimuseettinen neuvottelukunta, Valtakunnallinen terveydenhuollon eettinen neuvottelukunta, ETENE:n lääketieteellinen tutkimuseettinen jaosto, Koe-eläintoiminnan yhteistyöryhmä, Biotekniikan neuvottelukunta & Geenitekniikan lautakunta. 2003. Ihmisen kantasolut, kloonaukset ja tutkimus. Vantaa: Kirjapaino Keili Oy.

Ueno, S., Weidinger, G., Osugi, T., Kohn, A., Golob, J., Pabon, L., Reinecke, H., Moon, R. & Murry, C. 2007. Biphasic role for Wnt/ β -catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells. *PNAS* vol. 104:23:9685-9690.

Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D, Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Mugumura, K. & Sasai, Y. 2007. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 25, 681-686.

Xu, C. 2012. Differentiation and enrichment of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 52: 1203-1212.

Xu, C., Inokuma, M., Denham, J. Golds, K., Kundu, P., Gold, J. & Carpenter, M. 2001. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 19: 971-974.

Young, H & Black, A. Jr. 2004. Adult Stem Cells. *The Anatomical Record Part A* 276A:75-102.

LIITTEET

Liite 1. Immunosytokemiallisten värjäysten protokolla

Double-Fluorescence protocol

1. **WASH 2*5 min PBS** (1ml, 0.01 M, pH 7.4)
2. **FIXING 4% PFA 20 min** (0.7 ml)
3. **WASH 2 * 5 min PBS** (1 ml, 0.01 M, pH 7.4) LEAVE in PBS!
4. **BLOCKING: 10% NDS, 0.1% TritonX-100, 1% BSA in PBS 45 min RT**
5. **WASH: 1% NDS, 0.1% TritonX-100, 1% BSA in PBS**
6. **MIXTURE OF PRIMARIES: 1% NDS, 0.1% TritonX-100, 1% BSA in PBS in +4 C ON** (12 kuoppalevy: 300 µl primaari/kaivo)

ANTIBODY	DILUTION	ORIGIN
Troponin T	1:1500	Goat

7. **WASH 3 * 5-7 min 1 % BSA in PBS**
8. **MIXTURE OF SECONDARIES: 1% BSA in PBS 1h RT**

ANTIBODY	DILUTION	ORIGIN
Anti-goat	1:800	Donkey

9. **WASH 3 * 5 min in PBS**
10. **WASH 2 * 5 min in PB**
11. **Dry and mount with Vectashield+ coverslips**
12. **Store + 4C light protected**